

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Análisis virológico y epidemiológico del síndrome de despoblamiento
de las colmenas en España: estudio de causas y consecuencias**

**Virilological and epidemiological analisys of colony collapse disorder in
Spain : study of causes and consequences**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marina Vicente Rubiano

Directores

José Manuel Sánchez-Vizcaíno

Joaquín Goyache Goñi

Deborah Kukiélka Zunzunegui

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal

Centro VISAVET



**Análisis virológico y epidemiológico del Síndrome de
Despoblamiento de las Colmenas en España. Estudio de
causas y consecuencias**

**Virological and Epidemiological analysis of Colony Collapse
Disorder in Spain. Study of causes and consequences**

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

Dña. Marina Vicente Rubiano

DIRIGIDA POR LOS DOCTORES

Prof. Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno

Prof. Dr. Joaquín Goyache Goñi

Dra. Deborah Kukiela Zunzunegui

MADRID 2015



D. José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, Doctor en Veterinaria y Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

D. Joaquín Goyache Goñi, Doctor en Veterinaria y Profesor Titular de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

Dña. Deborah Kukiélka Zunzunegui, Doctora en Veterinaria. Acreditada como profesora contratada doctor (ANECA). Analista científico en Luzán 5.

CERTIFICAN

Que Dña Marina Vicente Rubiano, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Análisis virológico y epidemiológico del Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas en España. Estudio de causas y consecuencias”, considerando que reúne los requisitos necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral.

En Madrid, a de de 2015

Prof. Dr. J.M.
Sánchez-Vizcaíno

Prof. Dr. J. Goyache Goñi

Dra. D. Kukiélka
Zunzunegui

A mis padres, mi hermana y Anto

AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMIENTOS TEXTO

Nunca te das cuenta de lo que has hecho;

Sólo puedes ver lo que queda por hacer.

Marie Curie (1867-1934)

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN/ABSTRACT.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
1. LAS ABEJAS Y LA APICULTURA.....	3
1.1. Especies y distribución	3
1.2. Generalidades de la biología de las abejas <i>Apis mellifera</i>	5
1.3. Apicultura	8
2. IMPORTANCIA DE LA ABEJA.....	9
2.1. Beneficios directos: el sector apícola español	10
2.2. Beneficios indirectos: importancia de la polinización	13
3. PROBLEMÁTICA ACTUAL: DESAPARICIÓN DE LAS ABEJAS	14
3.1. Causas de la pérdida de colmenas.....	16
4. ENFERMEDADES VÍRICAS	26
4.1. Taxonomía y genoma	27
4.2. Tipos de infección vírica	30
4.3. Características específicas de los virus de abeja	31
4.4. Diagnóstico de enfermedades víricas en abejas	39
4.5. Epidemiología de enfermedades víricas	47
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	53
JUSTIFICACIÓN	55
OBJETIVOS	56
RESULTADOS.....	57

OBJETIVO 1: DETERMINAR LA POTENCIAL RELACIÓN DE IAPV CON EL SDC EN COLONIAS DE ABEJAS EN ESPAÑA.....	59
<i>RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 1</i>	61
OBJETIVO 2: ANALIZAR LA PRESENCIA DE VIRUS DESCONOCIDOS POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN EL SDC MEDIANTE METAGENÓMICA	69
<i>RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 2</i>	71
OBJETIVO 3: DETERMINAR LAS PRÁCTICAS DE MANEJO DE LAS COLONIAS QUE PUEDEN INFLUIR EN EL EFECTO DE LAS INFECCIONES VÍRICAS SOBRE LA SALUD DE LAS COLONIAS	81
<i>RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 3</i>	83
OBJETIVO 4: ANALIZAR LA DINÁMICA Y LAS INTERACCIONES DE LOS VIRUS JUNTO CON OTROS PATÓGENOS Y SU IMPLICACIÓN EN EL DEBILITAMIENTO DE LAS COLONIAS.....	97
<i>RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 4</i>	99
DISCUSIÓN	119
1. DIAGNÓSTICO DE VIRUS COMO POTENCIALES CAUSANTES DE LA PÉRDIDA DE COLONIAS.....	122
2. ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO: LOS VIRUS COMO PARTE DE UN PROBLEMA MULTIFACTORIAL.....	127
3. PERSPECTIVAS Y LÍNEAS DE FUTURO	132
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	135
PRIMERA/FIRST	137
SEGUNDA/SECOND	137
TERCERA/THIRD	137
CUARTA/FOURTH	138
QUINTA/FIFTH	138
SEXTA/SIXTH.....	138
BIBLIOGRAFÍA	139
ANEXOS	155

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABPV	Virus de la parálisis aguda
Ac	Anticuerpos
ACP	Análisis de componentes principales
ADN (DNA)	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AGID	Inmunodifusión en gel de agarosa
AIV	Virus iridiscente
ALPV	Virus de la parálisis letal de los ápidos
AmFV	Virus filamentosos
ARN (RNA)	Ácido ribonucleico
BQCV	Virus de la realera negra
BVX	Virus X de las abejas
BVY	Virus Y de las abejas
CBPV	Virus de la parálisis crónica
CGE	Copias de genoma equivalente
Ct	Ciclo umbral
DWV	Virus de las alas deformadas
dsDNA	ADN de cadena doble
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
EV	Virus Egipcio
IAPV	Virus de la parálisis aguda israelí
IRES	Sitio de entrada para el ribosoma interno
KBV	Virus Kashmir
LSV-1	Virus del lago Sinaí-1
LSV-2	Virus del lago Sinaí-2
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

OMG	Organismo modificado genéticamente
ORF	Marco de lectura abierto
PAGE	Separación por electroforesis en geles de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real
RdRp	Polimerasa ARN dependiente de ARN
RT	Retrotranscripción
SBPV	Virus de la parálisis lenta de la abeja
SBV	Virus de la cría ensacada o cría sacciforme
SDC (CCD)	Síndrome de despoblamiento de las colmenas
SDS-PAGE	PAGE en presencia de detergente de sodio dodecil sulfato
iRNA	ARN de interferencia
ssRNA	ARN de cadena simple
TSBV	Virus de la cría ensacada tailandés
TuRSV	Virus del mosaico del nabo
VDV-1	Virus Varroa destructor-1
VP	Proteína vírica
WB	Western Blot

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los virus de abejas.

Tabla 2. Tipos de infección vírica en insectos.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de abeja del género *Apis*.

Figura 2. Distribución mundial de las especies del género *Apis* y distribución de las subespecies de *Apis mellifera* en Europa.

Figura 3. Castas de abejas *Apis mellifera*.

Figura 4. Desarrollo de la abeja.

Figura 5. Dinámica de la colonia. Días de vida de las abejas obreras a lo largo del año en comparación con la población total de la colmena.

Figura 6. Evolución del número de explotaciones apícolas en España 2008-2015. Distribución por Comunidades Autónomas.

Figura 7. Producción de miel y cera en España en 2013. Distribución por Comunidades Autónomas.

Figura 8. Censo apícola en la Unión Europea 2011-2013. Distribución por países.

Figura 9. Abeja polinizando una inflorescencia.

Figura 10. Cuadros de una colmena con síntomas de SDC en EEUU.

Figura 11. Colmena con loque.

Figura 12. Detalle de estadios larvarios afectados por la ascosferosis, popularmente conocidos como “momias”.

Figura 13. Esporas de *Nosema ceranae* (izquierda) y *Nosema apis* (derecha) usando el mismo aumento (400x) en un microscopio compuesto.

Figura 14. Imágenes de *Acarapis woodi*, *Aethina tumida* y *Tropilaelaps clareae*.

Figura 15. Imágenes de *Varroa destructor*.

Figura 16. Triángulo de relación entre la abeja (hospedador), los patógenos de la abeja y el medio ambiente de la colonia.

Figura 17. Esquema del genoma de los virus de las familias *Dicistroviridae* e *Iflaviridae*.

Figura 18. Abeja con alas deformadas.

Figura 19. Partículas de ABPV al microscopio electrónico.

Figura 20. Extracción de hemolinfa en un experimento in vivo.

Figura 21. Ejemplo de curva estándar.

Figura 22. Esquema del procedimiento a seguir en metagenómica.

Figura 23. Toma de muestras de colmenas comerciales.

RESUMEN/ABSTRACT



RESUMEN

La abeja de la miel *Apis mellifera* es la principal especie polinizadora empleada por el hombre para aumentar la productividad de los cultivos, y además desempeña una importante función en el mantenimiento de la biodiversidad en todo el mundo. En las últimas décadas, se ha apreciado un incremento de la mortalidad de las colonias de abejas en numerosas regiones, lo que ha llevado a generar una gran alarma debido a sus potenciales repercusiones económicas y medioambientales. Este fenómeno, caracterizado por no tener una causa conocida, se ha clasificado principalmente en “Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas” (SDC), cuando presenta una sintomatología concreta de despoblamiento de abejas adultas, o simplemente “mortalidad invernal”, cuando las colmenas no superan el invierno por causas no identificadas. Estas pérdidas se han observado también en España, el país con mayor censo de colmenas de la Unión Europea e importante productor de miel. Esta situación ha generado la necesidad de estudiar las causas de tales pérdidas. Actualmente se considera que no existe una causa única que explique esta mortalidad sino que, por el contrario, se trata de un fenómeno en el que la interacción de varios factores afecta a las colonias. Entre estos factores considerados ‘de riesgo’ destacan la mala nutrición y la escasez de recursos, la climatología adversa y el cambio climático, la exposición a pesticidas neonicotinoides empleados en los cultivos donde pecorean las abejas, la presencia de depredadores naturales y especies invasoras y la acción de los patógenos presentes en las colmenas. Entre los patógenos que pueden afectar a la abejas, destacan los virus porque a pesar de conocerse su amplia distribución y prevalencia en las colmenas y haber sido asociados con eventos de mortalidad de colonias de abejas, aún son muchos los interrogantes sobre su patogenia, cómo se ven afectados por otros factores y cómo son capaces de alterar el equilibrio con el hospedador produciendo estados patológicos.

Esta tesis doctoral, que lleva el título **“Análisis virológico y epidemiológico del Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas en España. Estudio de causas y consecuencias”**, se ha centrado en el estudio de la implicación de los virus de abeja en las pérdidas de colmenas desde una perspectiva global, estudiando tanto aspectos del diagnóstico de virus, como de su epidemiología, considerando la asociación con otros factores que tienen un potencial efecto sobre las colonias. El trabajo desarrollado en la presente tesis ha generado cuatro artículos científicos, dos de ellos publicados y otros dos en fase de revisión en revistas científicas de impacto. Por un lado, estos artículos abarcan la

aplicación del diagnóstico molecular y la metagenómica para la detección de virus presentes en muestras de colmenas que presentan síntomas compatibles con el SDC (objetivos 1 y 2). Por otro lado, considerando las peculiaridades de las infecciones víricas en abejas y que las pérdidas de colmenas son un fenómeno multifactorial, se ha integrado el diagnóstico vírico en estudios epidemiológicos en los que se han considerado la influencia de otros factores, tanto internos como externos a la colmena, en el efecto patógeno que producen los virus. Así, se ha estudiado la presencia, carga vírica y estacionalidad de los virus de abeja que destacan por su potencial patógeno en dos regiones de España, Andalucía y Comunidad de Madrid, y se ha evaluado su relación con factores como las técnicas de manejo y la presencia de otros patógenos en la colmena (objetivos 3 y 4).

El **primer objetivo** de esta tesis doctoral fue estudiar la potencial relación del virus de la parálisis aguda israelí (IAPV) con el SCD en colonias de abejas en España. Este virus había sido señalado como potencial indicador del SDC en EEUU en 2007, y su presencia en España fue detectada a partir del año 2010. En este objetivo, sin embargo, se cuantifica por primera vez y se analiza su potencial implicación con el SDC en nuestro país, seleccionando como área de estudio la CCAA de Andalucía. Se determinó mediante RT-PCR que la frecuencia de IAPV en las colmenas muestreadas fue del 13.5% y la carga media 4.9×10^5 copias de genoma equivalente (CGE)/abeja, aunque se detectaron cargas de entre 10^2 y 10^7 CGE/abeja en las colonias muestreadas. Sin embargo, no se encontró asociación entre las colmenas que mostraban debilidad y la presencia de IAPV, observándose que las cargas más altas se encontraron tanto en colonias sanas como débiles. Esto parece indicar que altas cargas de IAPV no producen el colapso de las colmenas por sí solas, aunque sería interesante comprobar a nivel molecular e histopatológico si esta carga de IAPV produce daño a nivel individual. Además, se estudió el origen de la variante de IAPV presente en Andalucía mediante un análisis filogenético que reveló que dicha variante se agrupa junto con muestras de Francia en un clúster diferente del de la primera muestra descrita en España, concretamente en Valencia. Por tanto, estos resultados indican la presencia de dos linajes de IAPV evolutivamente distintos y con diferente origen en España.

El **segundo objetivo** de esta tesis doctoral fue analizar la presencia de virus desconocidos potencialmente implicados en el SDC mediante metagenómica. Este objetivo surge por las limitaciones del diagnóstico de virus de abeja como: la ausencia de producción de anticuerpos, la imposibilidad de emplear cultivos celulares para su crecimiento, las infecciones mixtas y las limitaciones propias del diagnóstico molecular, que requiere del

conocimiento previo de la secuencia del virus. La metagenómica se basa en la secuenciación masiva del genoma vírico, por lo que no se ve afectada por estas limitaciones y por tanto ofrece una alternativa y una oportunidad única para el estudio de los virus implicados en la pérdida de colonias. Mediante este enfoque, se estudiaron los virus presentes en una muestra de una colonia que presentaba síntomas de SDC en un colmenar de Navarra. Se detectaron tres virus de abeja en coinfección en la muestra: IAPV y, por primera vez en Europa, los virus de la parálisis letal de los ápidos (ALPV) y del Lago Sinaí (LSV), dos virus previamente descritos en EEUU de los que es necesario estudiar su patogenia y su efecto concreto en el SDC. Por su parte, en análisis filogenético de IAPV reveló su similitud con la variante previamente descrita en Andalucía y otras secuencias descritas en Francia, lo cual podría explicarse por su proximidad geográfica. Además, este estudio reveló que las abejas pueden ser portadoras de un virus de planta, el virus del mosaico del nabo (TuRSV), constituyendo un potencial vector de este virus.

El **tercer objetivo** de esta tesis doctoral fue determinar las prácticas de manejo que pueden influir en el efecto de las infecciones víricas sobre la salud de las colmenas. Entender el efecto de las prácticas de manejo sobre la dinámica de los virus en las colonias puede ayudar en su optimización como estrategia para la prevención de enfermedades víricas, que pueden desencadenar el colapso de las colonias. Para ello se realizó un extensivo muestreo en la CCAA de Andalucía para caracterizar las prácticas de manejo y la presencia y carga de virus de abeja (virus de las alas deformadas (DWV), virus de la realera negra (BQCV), virus de la parálisis aguda (ABPV), IAPV, virus Kashmir (KBV), virus de la cría sacciforme (SBV) y virus de la parálisis crónica (CBPV)), en dos muestreos en primavera-verano y otoño-invierno. Se observó un ligero empeoramiento del estado sanitario de las colonias en otoño-invierno, coincidiendo con una mayor presencia de enfermedad fúngica y síntomas inespecíficos como pillaje, aunque no se notificó la presencia de síntomas víricos. La presencia de virus fue común en ambos muestreos, aunque sólo BQCV y DWV fueron detectados en todas las provincias en los dos muestreos y sólo en el caso de DWV se apreció una tendencia de aumento de presencia y carga entre los dos muestreos, aunque no superaron el orden de 10^7 CGE/abeja y no se observaron síntomas de deformidad en las alas. El estudio de las relaciones entre las prácticas de manejo y la presencia de virus reveló tendencias para BQCV y DWV, destacando la asociación de prácticas y factores relacionados con la profesionalización con una menor presencia vírica. Por tanto, la formación en técnicas de manejo es esencial para mantener un óptimo estado sanitario de las colmenas.

El **cuarto objetivo** de esta tesis doctoral fue analizar la dinámica y las interacciones de los virus junto con otros patógenos y su implicación en el debilitamiento de las colmenas. Para ello se caracterizó la presencia de virus (DWV, BQCV, ABPV, IAPV, KBV y SBV), un microsporidio (*Nosema ceranae*) y un parásito (*Varroa destructor*), en muestras de abejas adultas y cría, durante las estaciones de primavera-verano y verano-otoño, en seis colmenares profesionales situados en entorno natural en la CCAA de Madrid. Se observó que la presencia de patógenos fue frecuente en las colonias durante primavera-verano, pero tanto la prevalencia como la carga de patógenos aumentaron en verano-otoño junto con la presencia de sintomatología evidente y debilidad en las colonias. El análisis de componentes principales mostró que las colonias de un mismo colmenar tienen presencia y cargas de patógenos similares, y por tanto, la caracterización del entorno de las colmenas puede ser clave en el estudio de la dinámica de los patógenos en las colonias. Por otro lado, se encontró una correlación positiva entre los virus BQCV y SBV en las dos estaciones, y una correlación entre DWV y *Varroa* en verano-otoño. El debilitamiento de las colonias se relacionó con la presencia de altas cargas de DWV en verano-otoño, cuando se observó la presencia de sintomatología abierta. Además, el estudio por separado de muestras de abejas adultas y cría reveló que la cría tiene mayor carga de DWV en esta época del año, indicando que puede ser una muestra interesante en el estudio de la interacción *Varroa*-DWV y su implicación en el colapso de las colonias. Por último, en este estudio se describe por primera vez la presencia del virus ABPV en España.

Por tanto, esta tesis doctoral ha supuesto un gran avance en el estudio de la implicación de los virus en la pérdida de colonias desde una perspectiva multidisciplinar, combinando diagnóstico y epidemiología, en colonias de España, cuyo sector apícola es el más importante de la Unión Europea en censos y producciones. Los resultados de esta tesis permitirán implementar medidas de control y vigilancia que ayuden a minimizar el efecto de los virus sobre las colmenas y a mantener el estado sanitario de las mismas.

ABSTRACT

The honey bee *Apis mellifera* is the main pollinator species used to increase the productivity of crops and it also has a central role in the conservation of the worldwide diversity. In the last decades, an increase in the mortality of honey bee colonies has been observed in many regions, causing a great alarm due to its potential economic and environmental consequences. This phenomenon, which has unknown causes, has been called “Colony Collapse Disorder” (CCD) when a depopulation of adult honey bees is observed, or “winter losses” when colonies do not survive to the winter by unidentified causes. These losses have also been observed in Spain, country within the European Union with the highest hive census and with important honey productions. This situation has generated the need to discover the cause of these losses. Nowadays it is considered that no single cause can explain this mortality, but this is a phenomenon where the interaction of multiple factors can affect honey bee colonies. Among these ‘risk’ factors some are highlighted, such as poor nutrition and lack of food resources, adverse climatology, exposure to neonicotinoid pesticides used in crops where bees forage, presence of natural predators and invasive species and presence of pathogens in the colonies. Viruses are important pathogens not only for their extensive prevalence and distribution and their association with colony mortality, but for the unknown aspects about their pathogenicity, how viruses can be affected by other factors and how viruses can alter the balance with the host leading to a pathological status.

This doctoral thesis, entitled **“Virological and Epidemiological analysis of Colony Collapse Disorder in Spain. Study of causes and consequences”**, has focused in the study of the implication of honey bee viruses in colony losses from a global perspective, considering both viral diagnosis and epidemiology of viruses in association with other factors which may have a potential effect on honey bee colonies. The work developed in this thesis has produced four scientific articles, two of them published and two of them under review in scientific journals. On one hand, these articles comprise molecular diagnosis and metagenomics for the detection of viruses in samples from colonies with symptoms compatible with CCD (objectives 1 and 2). On the other hand, regarding the peculiarities of viral infections in honey bees and the multifactorial origin of colony losses, viral diagnosis has been integrated in epidemiological studies where the influence of other factors in the pathological effect of viruses has been considered, including both internal and external factors. Thus, this thesis has studied the presence, load

and seasonality of honey bee viruses important for their potential pathogenicity in two Spanish regions, Andalucía and Madrid. The relationships between bee viruses and other factors such as beekeeping practices and presence of other pathogens have also been evaluated (objectives 3 and 4).

The **first objective** of this thesis was studying the potential relationship between Israeli acute paralysis virus (IAPV) and CCD in honey bee colonies in Spain. This virus was described as an indicator of CCD in USA in 2007, and its presence in Spain was detected in 2010. However, this objective quantifies for the first time and analyzes the potential implication of IAPV in CCD in Spain, selecting the region of Andalucía as study area. The frequency of IAPV in the sampled colonies, diagnosed by RT-PCR, was 13.5% and the average viral load 4.9×10^5 GEC/bee, although loads between 10^2 and 10^7 GEC/bee were detected in the sampled colonies. However, no association between weak colonies and IAPV was observed and the highest IAPV loads were found both in healthy and weak colonies. These results suggest that high IAPV loads do not produce colony collapse by themselves, although further studies regarding histopathological analysis of individual honey bees would be interesting to assess the effect of these IAPV loads. Therefore, the origin of the IAPV isolate from Andalucía was studied using phylogenetic analysis, which revealed an association with sequences from France in a cluster different from the Spanish sample previously described in Valencia. Thus, these results indicate the presence of two different evolutionary lineages of IAPV with different origin in Spain.

The **second objective** of this thesis was analyzing the presence of unknown viruses potentially implicated in SDC using metagenomics. This objective arises due to the limitations of the diagnosis of honey bee viruses such as: the lack of antibodies, the lack of cell cultures, the usual presence of viruses in coinfections and the limitations of molecular diagnosis, which requires the previous knowledge of the viral sequence. Metagenomics is based on the high-throughput sequencing of viral genomics, overcoming these limitations and thus, offering an alternative and a unique opportunity to study viruses implicated in colony losses. Using this approach, the presence of viruses was analyzed in one sample from a colony with CCD in Navarra. Three viruses were coinfecting this sample: IAPV and, for the first time in Europe, aphid lethal paralysis virus (ALPV) and Lake Sinai virus (LSV), two viruses previously described in USA which require further studies about their pathogenicity in honey bees and their role in CCD. The phylogenetic analysis of IAPV revealed similarities with the isolate from Andalucía previously described and other sequences in France, probably due to the geographical proximity. This study also revealed

that honey bees can carry a plant virus, turnip ringspot virus (TuRSV), potentially serving as important vector organisms.

The **third objective** of this thesis was determining which beekeeping practices can influence in the effect of viral infections in colony health. Understanding the effect of beekeeping practices in colony health can help to its optimization as a strategy for the prevention of viral diseases that can lead to the colony collapse. An extensive sampling was performed in the region of Andalucía to characterize beekeeping practices and the presence and load of honey bee viruses (deformed wing virus (DWV), black queen cell virus (BQCV), acute bee paralysis virus (ABPV), IAPV, Kashmir virus (KBV), sacbrood virus (SBV) and chronic bee paralysis virus (CBPV)) in two samplings in spring-summer and autumn-winter. A slight deterioration of health status was appreciated in autumn-winter, together with fungal disease and unspecific symptoms such as kleptoparasitism of neighboring colonies, although no viral symptoms were appreciated. The presence of bee viruses was common in both samplings, however only BQCV and DWV were detected in all provinces in both samplings, and only DWV showed increased frequency and load between samplings to a maximum of 10^7 GEC/bee and without presence of wing deformities. Trends regarding associations between beekeeping practices and honey bee viruses were observed for BQCV and DWV. Importantly, association between beekeeping practices and factors related to professionalization and lower virus presence was found. Thus, training courses in beekeeping practices are essential for maintaining an optimal health status of colonies.

The **fourth objective** of this thesis was to analyze the dynamics and interactions of honey bee viruses with other pathogens and their implication in colony weakening. To that end the presence of viruses (DWV, BQCV, ABPV, IAPV, KBV and SBV), one microsporidium (*Nosema ceranae*) and one parasite (*Varroa destructor*) was analyzed in samples from adult bees and brood, in spring-summer and summer-winter seasons in six professional apiaries located in natural environments in Madrid. Although the presence of pathogens was frequent in spring-summer, prevalences and loads increased in summer-autumn together with the presence of overt symptomatology and colony weakening. Principal component analysis revealed that colonies from the same apiary have similar pathogen presence and load, and thus, characterization of the environment of colonies could be essential in the study of pathogen dynamics in honey bee colonies. Moreover, a positive correlation was found between BQCV and SBV loads in the two samplings, and between DWV and *Varroa* only in summer-autumn. Weakening of colonies was associated

with the presence of high DWV loads in summer-autumn, when overt symptoms were also observed. Therefore, study of adult and brood samples separately also revealed that brood samples had higher DWV load in this season, indicating that this is an interesting sample in the study of Varroa-DWV dynamics and implications in colony collapse. Finally, we first report the presence ABPV for the first time in Spain.

Thus, this thesis represents a major progress in the study of the implication of honey bee viruses in colony losses from a multidisciplinary perspective, combining diagnosis and epidemiology, in colonies of Spain, which has the highest census and honey productions in the European Union. The results obtained in this thesis will allow the implementation of control measures and surveillance which could help to minimize the effect of viruses in colonies, maintaining their health status.

INTRODUCCIÓN



1. LAS ABEJAS Y LA APICULTURA

1.1. Especies y distribución

Las abejas melíferas o abejas de la miel son unos insectos pertenecientes al orden Hymenoptera y a la familia *Apidae*, que engloba unas 40000 especies de abejas y abejorros, incluyendo abejas sociales, pero también abejas solitarias y parásitas (Gupta et al. 2014). Dentro de esta familia se encuentra el género *Apis*, que engloba nueve especies de abejas melíferas sociales.

Estas nueve especies se clasifican en tres linajes en función del tipo de nido y de su tamaño (Figura 1A y 1B):

- Aquellas que construyen nidos con panales paralelos en espacios naturales cerrados tales como huecos de árbol y oquedades. Este hecho ha permitido al ser humano el aprovechamiento de estas especies en su beneficio mediante la reproducción de los nidos en colmenas cerradas. A este linaje pertenecen las especies *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis koschevnikovi*, *Apis nigrocincta* (abeja melífera de Filipinas) y *Apis nuluensis* (abeja melífera de Borneo), siendo las dos primeras las más empleadas en la práctica de la apicultura tradicional.
- Aquellas que realizan sus nidos en espacios abiertos tales como ramas de árboles o adheridos a rocas. En este grupo se engloban el linaje de abejas gigantes, *Apis dorsata* y *Apis laboriosa* (abeja melífera del Himalaya) y el linaje de abejas enanas *Apis florea* y *Apis adeniformis*.

De todas estas especies la más distribuida a nivel global es *Apis mellifera*, encontrándose originalmente en Europa y África, noroeste de Asia, Oriente Próximo, Cáucaso y la meseta Iraní, y expandiéndose a América y Australia gracias a la exportación de colmenas (Figura 2A). Existen multitud de subespecies de esta abeja, especialmente en Europa (Figura 2B), así como híbridos entre subespecies, como la abeja africanizada, un híbrido entre *Apis mellifera mellifera* y *Apis mellifera scutellata* (una de las subespecies africanas) que se distribuye por Sudamérica y parte de Norteamérica.

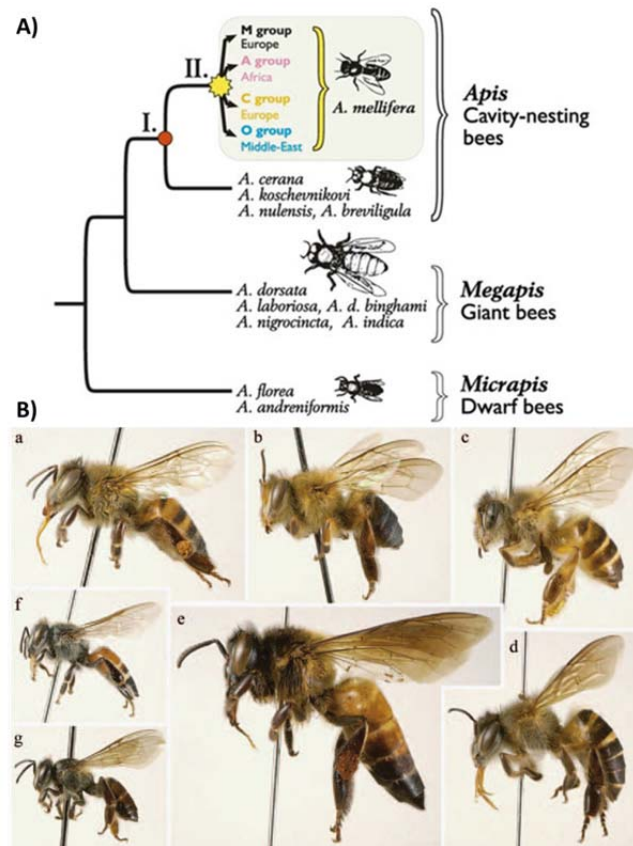


Figura 1. Tipos de abeja del género *Apis*. A) Evolución de los diferentes tipos de abeja: abejas que construyen nidos en oquedades (*Apis*), abejas gigantes (*megapis*) y abejas enanas (*micrapis*). B) Comparativa de morfología y tamaño de cada una de las especies del género *apis*. a) *Apis* (*Apis*) *mellifera*; b) *A. (A.) koschevnikovi*; c) *A. (A.) nigrocincta*; d) *A. (A.) cerana*; e) *A. (Megapis) dorsata*; f) *A. (Micrapis) florea*; g) *A. (M.) andreniformis*. Fuente: Engels et al., 2009.

El resto de especies se distribuye por parte de África y por el continente asiático, desde Medio Oriente hasta Filipinas y Japón. En Asia la abeja predominante es *Apis cerana*, que se emplea en la apicultura, mientras que el resto de especies asiáticas se encuentran en áreas más restringidas y se emplean fundamentalmente para la extracción de miel en la propia ubicación natural del panal.

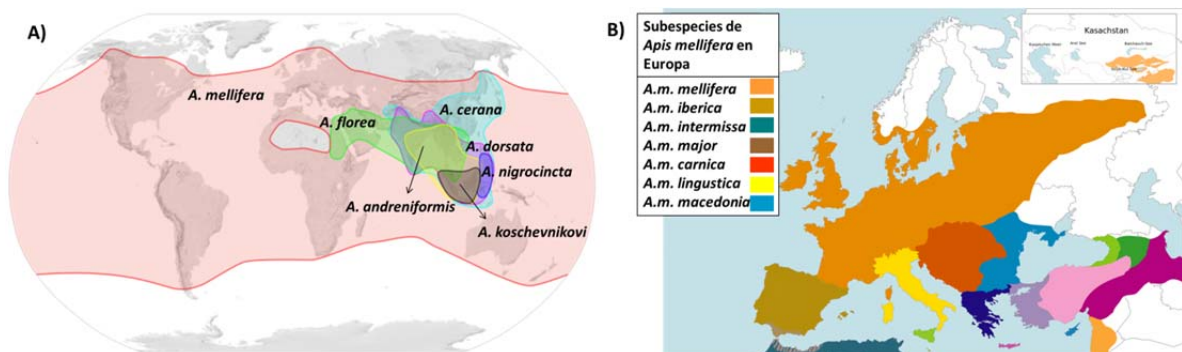


Figura 2. A) Distribución mundial de las especies del género *Apis*. Fuente: elaboración propia a partir de(Gupta et al. 2014). B) Distribución de las subespecies de *Apis mellifera* en Europa. Fuente: Karl Udo Gerth, wikimedia.com, 2014.

La abeja asiática *Apis cerana* se caracteriza por ser de menor tamaño que su pariente europea, *Apis mellifera*. Ambas especies descienden de un antepasado común, pero han evolucionado hasta convertirse en especies genéticamente diferentes que no se pueden reproducir entre sí. Estas dos especies también se distinguen en su susceptibilidad a distintas enfermedades especialmente en lo que concierne al ácaro *Varroa destructor*, parásito originario de la abeja asiática (Rosenkranz et al. 2010). Debido a su actividad y a las características de los nidos que construyen, que facilitan su manejo, ambas especies de abejas son las principales empleadas en la apicultura de hoy en día.

1.2. Generalidades de la biología de las abejas *Apis mellifera*

Las abejas son insectos sociales con un alto grado de especialización y organización. El conjunto de abejas que descienden de una misma abeja reina se denomina **colonia**. Su estructura social se compone de grupos de abejas con distintas funciones, denominados “castas”. Existen tres castas de abejas: abeja reina, abeja obrera y zánganos (Figura 3). La abeja reina y las obreras son las hembras y proceden de huevos fecundados y por lo tanto son individuos diploides ($2n$). En cambio, los zánganos son los machos y proceden de huevos sin fecundar, por lo que son haploides (n).

Abeja reina. La abeja reina es la única hembra fértil de la colonia y es la base sobre la que se sustenta la misma, ya que tiene como funciones la reproducción de la colonia y el mantenimiento de su cohesión. En cada colonia de abejas existe una sola abeja reina que mediante la emisión de feromonas mantiene unida la colmena y evita la formación de nuevas reinas. Estas abejas nacen en celdillas especiales llamadas “realeras”, más alargadas que una celdilla normal de abeja obrera. Además, son alimentadas desde su eclosión con jalea real, producida por las abejas obreras nodrizas. Su composición permite el desarrollo del aparato reproductor de la reina. Al poco tiempo de nacer realiza varios vuelos en los que es fecundada por los zánganos. Gracias a su espermateca la reina puede controlar la fecundación de cada huevo por lo que puede poner huevos fecundados o sin fecundar en función de las necesidades de la colmena, dando lugar a abejas obreras o a zánganos, respectivamente. Aunque pueden vivir hasta cinco años, generalmente se renuevan de forma natural cada dos o tres años, o artificialmente cada dos.

Abeja obrera. Las abejas obreras son la casta más numerosa y la que realiza mayor número de funciones en la colmena. Una colmena normal en climas templados puede tener entre 20000 y 80000 abejas obreras, dependiendo de la estación del año (BYBA. 2015). Las

funciones que desempeñan las abejas obreras varían con la edad. En primer lugar las abejas son limpiadoras y realizan tareas de limpieza en las celdillas de los panales; después pasan a ser nodrizas y se ocupan del cuidado de la cría; tras esto se convierten en cereras y construyen los panales de cera; más tarde son almacenadoras y colocan el alimento en las celdillas de miel y polen. Las abejas obreras de más edad son las guardianas, que evitan la entrada de abejas de otras colmenas y defienden la colmena de los depredadores; ventiladoras, que se encargan de generar corrientes de aire para mantener la constante la temperatura de la colmena y para deshidratar el néctar y convertirlo en miel; su última tarea es la de pecoreadoras, que se encargan de recoger el néctar y el polen de las flores, así como de proveer a la colmena de agua. La distancia de pecoreo habitual de las abejas es de entre dos y tres kilómetros, aunque dependiendo de la disponibilidad de recursos puede variar desde uno hasta 10 kilómetros. Una vez una primera abeja pecoreadora (exploradora) ha encontrado un recurso, regresa a la colmena y comunica al resto de pecoreadoras la posición exacta respecto al sol mediante la conocida como “danza de las abejas”.

Zángano. La función del zángano es básicamente fecundar a la abeja reina mediante varios vuelos nupciales en los que la reina inicia un vuelo en vertical y es alcanzada sólo por los zánganos más vigorosos. En el interior de la colmena sus funciones son más discutidas, aunque se considera que ayudan a mantener el calor de la colmena y a repartir el néctar.

Anatómicamente estas tres castas se distinguen por su morfología, siendo la más pequeña la abeja obrera. Los zánganos se distinguen por el mayor tamaño de su abdomen y sus ojos, y la abeja reina por su abdomen alargado, debido al desarrollo de su aparato reproductor.



Figura 3. Castas de abejas *Apis mellifera*. Fuente: elaboración propia a partir de alexanderwild.com.

Cuando la abeja reina realiza la puesta del huevo, éste eclosiona el día 4 dando lugar a una larva. La larva es alimentada por las abejas nodrizas y aumenta su tamaño hasta el día 8, en el que adquiere una orientación vertical dentro de la celdilla, con el extremo anterior orientado hacia fuera. El día 9 las abejas nodrizas operculan la celdilla para que la larva sufra la metamorfosis, pasando de pupa a adulta, hasta el día 21, que emerge de la celdilla. Este ciclo es más largo en el caso de los zánganos, ya que las celdillas se operculan el día 10 y emergen el día 24. En cambio, en el caso de la abeja reina, el ciclo es más corto, con una duración de 16 días, y se realiza en la llamada “celda real o realera” (Figura 4).

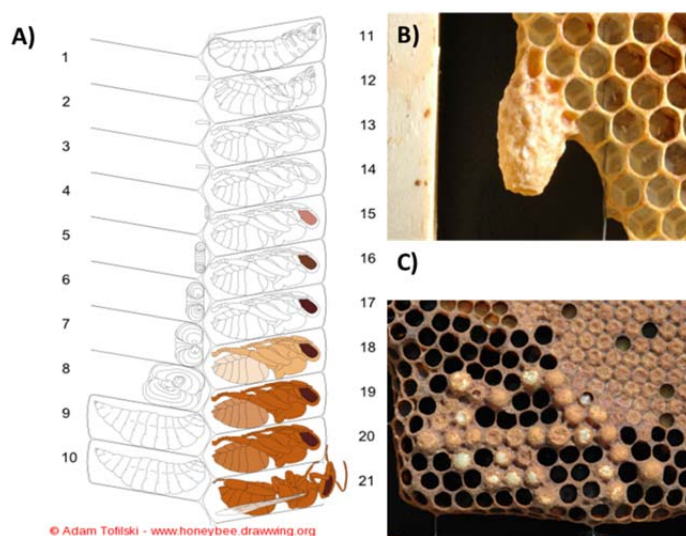


Figura 4. Desarrollo de la abeja. A) Esquema del desarrollo de una abeja obrera en el interior de la celdilla de cría. B) Detalle de una celda real o realera. C) Detalle de cría operculada de abejas obreras (parte superior de la imagen) y de zángano (parte inferior de la imagen). Fuente: elaboración propia a partir de honeybee.drawwing.org y extensión.org.

La dinámica poblacional de las colmenas es fundamental para entender el funcionamiento de la misma. En climas templados, durante la primavera comienza la época de cría, en la que aumenta la población de la colmena, que alcanza su máximo en verano (Figura 5). Las abejas obreras nacidas en esta época tienen una vida corta, entre 28-40 días en primavera y hasta 80 días en verano, ya que la tasa de reposición es alta. Sin embargo, en otoño disminuye considerablemente la puesta de la reina para preparar la colmena para el periodo de baja actividad o “hibernación”. Las abejas nacidas en otoño son por esta razón más longevas, viviendo entre 90 y 140 días, para poder llegar a la primavera con suficiente población para protegerse de las adversidades climatológicas y de la baja disponibilidad de recurso.

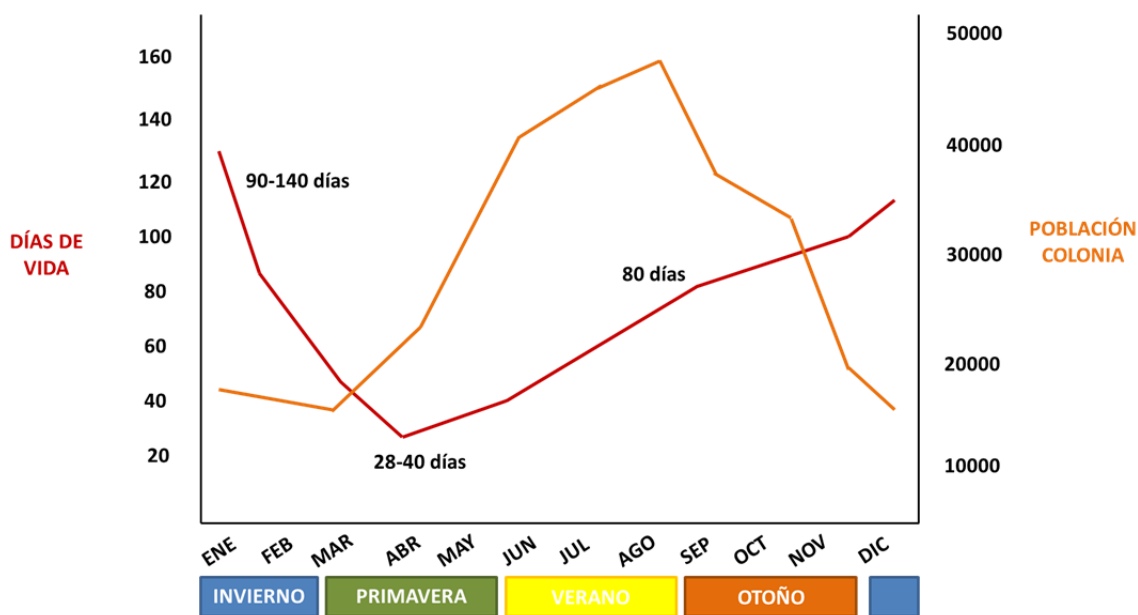


Figura 5. Dinámica de la colonia. Días de vida de las abejas obreras a lo largo del año en comparación con la población total de la colmena. Fuente: Elaboración propia.

1.3. Apicultura

La apicultura (apis: abeja, cultura: cultivo o cuidado) se define como la ciencia o el arte de criar abejas para aprovechar sus productos (RAE. 2015). Las primeras evidencias sobre el aprovechamiento de la labor de las abejas por parte del hombre datan del mesolítico, con pinturas rupestres en las que se observa la recolección de miel en panales silvestres. Con el auge de las grandes civilizaciones de la antigüedad el hombre empezó a criar colonias de abejas en recipientes tales como vasijas de cerámica o mimbre, tal como indican los jeroglíficos del año 2500 a.C. en Egipto y los restos arqueológicos en China. En Asia Menor existió una gran admiración por las abejas, destacando el pueblo Hitita, que ya dejó constancia escrita alrededor del año 1500 a.C. de su actividad apícola (Crane. 2013). En España la primera referencia a la apicultura aparece sobre el año 1500 a.C. con el pueblo Tartesso, que se asentó en el sur de la Península. Más tarde aparecen referencias a la apicultura en el Imperio Romano, con el tratado *De Re Rustica* en el año 50 d.C., escrito por Lucio Junio Moderato Columela, así como en documentos árabes como el volumen 9 del *Tratado de Agricultura* de Abu Zacariah lahia. En la época medieval Alfonso X llevó a cabo las primeras ordenanzas sobre la apicultura y en el siglo XIV Méndez de Torres escribió sobre la apicultura en España y estableció conceptos sobre la reproducción de las abejas. Sin embargo, se trataba de una apicultura tradicional en el que el conocimiento que se tenía de la biología de la abeja era muy limitado. A partir del siglo XVIII, cuando se

realizaron descubrimientos básicos sobre la biología de las abejas, la apicultura empezó a desarrollarse y tecnificarse hasta convertirse en la actividad que conocemos hoy en día.

Al mismo tiempo que se ampliaba el conocimiento sobre las abejas, los apicultores adaptaban las técnicas empleadas para manejar las colonias. Esta evolución se ha apreciado claramente en el elemento que se usa para mantener las colonias en un lugar: la colmena. Las primeras colmenas empleadas en la apicultura eran **colmenas fijistas o estantes**, ya que permanecían fijas en el mismo lugar durante todo el año. Estas colmenas tenían en común un aprovechamiento limitado de las colonias, ya que para la extracción de miel se cortaban los panales lo que implicaba que las colonias debían reconstruir los panales para la temporada siguiente. Más recientemente, con el desarrollo de la apicultura, se idearon las **colmenas movilistas** (Langstroth. 1852), que consisten generalmente en cajas de madera que contienen cuadros móviles en los que las abejas construyen los panales. Estas colmenas han propiciado el desarrollo de una apicultura más tecnificada e intensiva.

Igualmente, existen dos tipos de apicultura: la **apicultura sedentaria o estante** y la **apicultura trashumante**. En la apicultura estante las colmenas permanecen todo el año en el mismo emplazamiento por lo que son altamente dependientes de las condiciones del medio ambiente que las rodea. En la apicultura trashumante las colmenas son trasladadas a otros emplazamientos en distintas épocas del año para aprovechar las floraciones y las condiciones climatológicas adecuadas. El desarrollo de la apicultura trashumante ha permitido obtener máximos rendimientos en la producción apícola, así como aumentar la producción de numerosos cultivos gracias a la labor polinizadora de las abejas.

2. IMPORTANCIA DE LA ABEJA

La actividad de la abeja *Apis mellifera* conlleva numerosos beneficios en dos aspectos diferentes pero complementarios. En primer lugar, el manejo de colonias de abejas en la apicultura da lugar a una serie de **beneficios directos**, traducidos en productos de la actividad apícola cuya venta supone un beneficio económico. Dentro de estos productos se encuentra principalmente la miel, y como productos secundarios podemos encontrar cera, polen y propóleo. Así mismo, la actividad polinizadora de la abeja produce **beneficios indirectos** que se traducen en el aumento de los rendimientos de numerosos cultivos de los que depende en gran medida nuestra dieta.

2.1. Beneficios directos: el sector apícola español

2.1.1. Censos

El sector apícola español es uno de los más importantes a nivel tanto europeo como mundial. En los últimos datos publicados sobre el sector España es el país europeo con mayor censo de colmenas, contabilizado en 2.459.373 colmenas, lo que supone el 17.6% de las colmenas totales de Europa (MAGRAMA. 2015). Las CCAA con mayor censo de colmenas son Andalucía, Extremadura, Castilla y León y Comunidad Valenciana, siendo las CCAA de Extremadura y Andalucía las que más han crecido desde 2008 hasta 2015, un 57.7% y un 26.5%, respectivamente. En cuanto a las explotaciones apícolas registradas, es Castilla y León la que cuenta con un mayor número (16.5% del total en España), seguida de Andalucía (15.9%) y Galicia (12.8%) (Figura 6). Si clasificamos las explotaciones apícolas por sistema productivo, la mayor parte corresponde a colmenares estantes (63.2%).

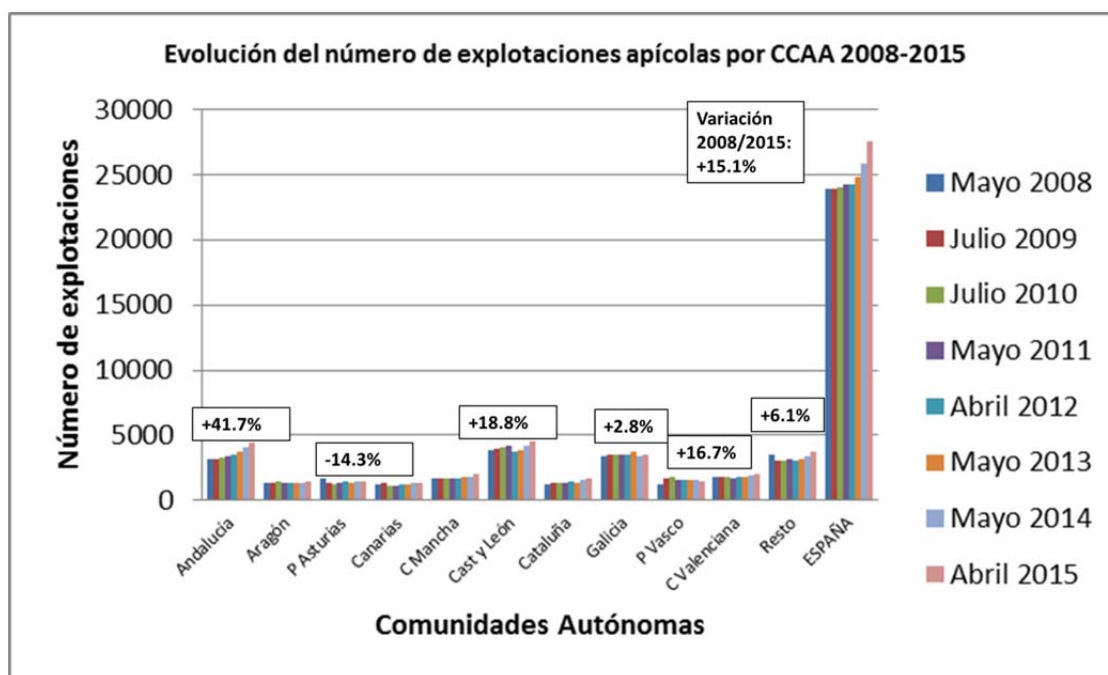


Figura 6. Evolución del número de explotaciones apícolas en España 2008-2015. Distribución por Comunidades Autónomas. Fuente: Elaboración propia a partir de MAGRAMA, 2015.

2.1.2. Productos apícolas

Los principales productos derivados de la actividad apícola son miel, cera, polen, propóleo y jalea real. El sector apícola español destaca también por ser uno de los mayores productores de miel y cera de Europa, con un total de 30.614 Tm de miel y 1.711 Tm de cera producidas en 2013. Las CCAA con mayor producción de miel son la Comunidad

Valenciana (19.9% del total en España), Andalucía (19.1%) y Extremadura (18%) (Figura 7). Gran parte de la producción de miel se destina a la exportación, siendo España el segundo país exportador de miel después de Alemania. Se exporta miel mayoritariamente dentro de la UE, donde ha ido aumentando progresivamente desde 2004, y especialmente a Francia, Alemania e Italia, aunque también se exporta a terceros países. En cambio, las importaciones, que también han aumentado desde 2004, provienen fundamentalmente de terceros países, especialmente de China y Uruguay. No obstante, el autoabastecimiento de miel en España para 2014 se ha estimado en un 105.8%.

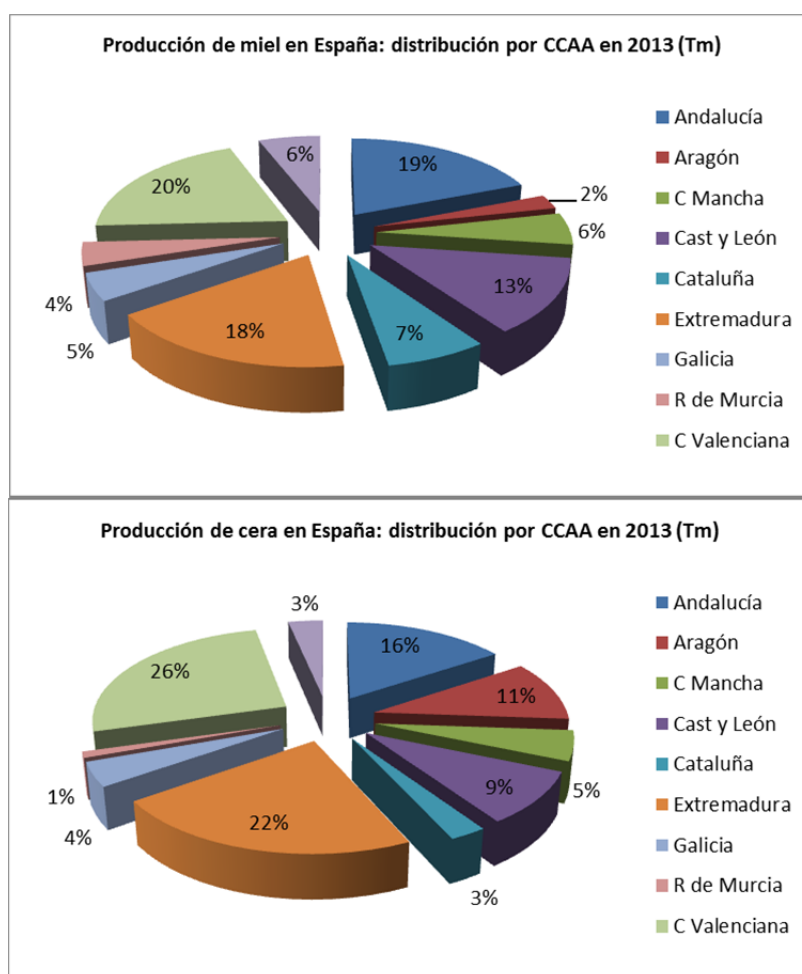


Figura 7. Producción de miel y cera en España en 2013. Distribución por Comunidades Autónomas. Fuente: Elaboración propia a partir de MAGRAMA, 2015.

2.1.3. Profesionalización del sector español

La profesionalización del sector apícola es un aspecto fundamental de este tipo de actividad ganadera, ya que implica una mayor tecnificación, formación en materia sanitaria

y de manejo, y en definitiva, un mayor rendimiento de las colmenas, que se traduce en un mayor beneficio económico.

El sector apícola español destaca por ser uno de los más profesionalizados de la UE, con un 80% de colmenas profesionales sobre el total de colmenas del país, lo que supone un 17.6% de las colmenas profesionales de la UE. Esta profesionalización se aprecia claramente también en el número de apicultores profesionales, ya que el 18.51% de apicultores españoles se engloban en esta categoría (Figura 8).

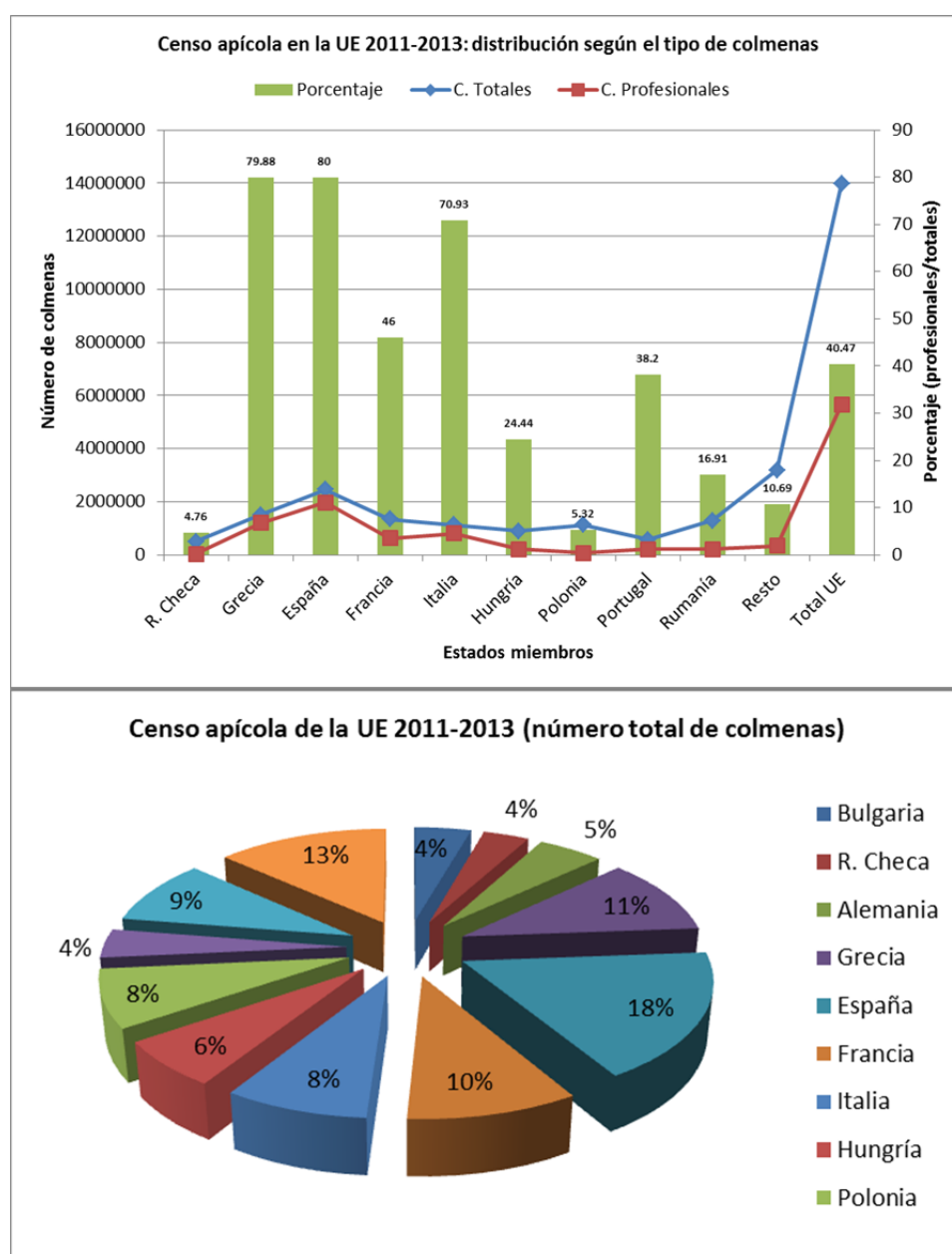


Figura 8. Censo apícola en la Unión Europea 2011-2013. Distribución por países. Fuente: Elaboración propia a partir de MAGRAMA, 2015.

2.2. Beneficios indirectos: importancia de la polinización

La contribución más importante de las abejas es sin duda su papel en la polinización. La polinización se define como el paso o tránsito del polen desde el estambre en que se ha producido hasta el pistilo en que ha de germinar (RAE. 2015). Los polinizadores son aquellos individuos que durante su actividad favorecen este tránsito de polen (Figura 9). Los polinizadores tienen por tanto un papel fundamental en la mayoría de los ecosistemas terrestres y prestan un servicio vital para mantener tanto la biodiversidad de la flora silvestre (Ashman et al. 2004; Potts et al. 2010a) como para la productividad de la agricultura (Klein et al. 2007). Las abejas son buenos polinizadores ya que en su actividad de pecoreo visitan numerosas flores para obtener tanto néctar como polen. El polen queda adherido tanto en las extremidades como en las vellosidades, facilitando su paso de una planta a otra. De hecho, la producción del 84% de especies cultivadas en Europa depende directamente de la polinización a través de insectos, especialmente las abejas (Williams. 1994). Se estima que 52 de las 115 principales fuentes de alimento para el hombre dependen directamente de la polinización tanto para la producción de frutos como de semillas (Klein et al. 2007). Aunque no son mayoritarios los cultivos que dependen en su totalidad de la polinización por parte de las abejas, la gran mayoría de ellos aumentan los rendimientos en cantidad y calidad cuando esta polinización ocurre. En términos económicos, se ha calculado que el valor global de la polinización a través de insectos es de 153 billones de euros anuales, lo que representa un 9.5% del total de la producción agrícola, y de 14.2 billones de euros tan sólo en Europa (Gallai et al. 2009). Muchos de estos cultivos son polinizados gracias al movimiento específico de colmenas para su polinización (trashumancia).



Figura 9. Abeja polinizando una inflorescencia. Fuente: inhabitat.com

3. PROBLEMÁTICA ACTUAL: DESAPARICIÓN DE LAS ABEJAS

Si bien la apicultura ha existido desde la antigüedad, no fue hasta finales del siglo XIX cuando se empezó a tecnificar y pasó a ser una actividad más intensiva. La intensificación trajo consigo el aumento del número de colmenas por asentamiento, y por tanto, los problemas sanitarios se hicieron más visibles y frecuentes. A pesar de esto, el aumento del conocimiento sobre estas enfermedades ha permitido establecer prácticas sanitarias y de manejo han permitido que las colmenas convivieran con ellas.

Sin embargo, a partir de la segunda mitad del siglo XX se ha observado un marcado descenso del número de colmenas, tanto en EEUU como en Europa. En una revisión sobre el estado de las colmenas se estimó con datos de la FAO que las pérdidas desde 1961 a 2007 fueron de 26.5% en Europa y de hasta 49.5% en EEUU (VanEngelsdorp y Meixner, 2010). Además, también se han documentado descensos acusados en el número de enjambres silvestres en estas dos regiones (Moritz et al. 2007; Jaffe et al. 2010; Potts et al. 2010b). Estos datos resultan especialmente alarmantes cuando pérdidas importantes se observan en periodos de tiempo cortos o en una misma temporada. Desde 1869 se han registrado al menos 18 episodios de pérdida inusual de colonias (Underwood y VanEngelsdorp, 2007). Sin embargo, en las últimas décadas, los fenómenos de este tipo se han observado con más frecuencia. Uno de los términos más empleados en los últimos años y que hace referencia a este fenómeno ha sido **“Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas”** (SDC o CCD por sus siglas en inglés) (Figura 10). Esta expresión fue acuñada en EEUU para definir un síndrome que se caracteriza por:

- La pérdida rápida de abejas obreras adultas en las colmenas afectadas, que se muestran como colonias débiles o muertas, con un exceso de cría en comparación con la población adulta y con abundantes reservas de miel y polen
- Una marcada falta de abejas obreras muertas tanto dentro como alrededor de la colmena afectada
- Una ausencia de invasión de la colmena afectada por especies invasoras (como el pequeño escarabajo de las colmenas o la polilla de la cera) y una ausencia de kleptoparasitismo de las colonias vecinas (pillaje) (Cox-Foster et al. 2007; Vanengelsdorp et al. 2009).



Figura 10. Cuadros de una colmena con síntomas de SDC en EEUU. Se aprecia la falta de individuos adultos en presencia de cría en los cuadros, que queda desatendida. Fuente: VanEngelsdorp et al., 2009.

El SDC fue notificado por primera vez en 2006 en EEUU, aunque se tienen evidencias de pérdidas anormales de colmenas consistentes con este síndrome desde 2004. Desde entonces se han observado pérdidas por encima de lo considerado como normal en años sucesivos (VanEngelsdorp et al. 2008; vanEngelsdorp et al. 2010; vanEngelsdorp et al. 2011), aunque en las últimas encuestas se ha detectado una disminución del fenómeno en EEUU (vanEngelsdorp et al. 2012).

Por otro lado, son ya numerosos los artículos que describen **“pérdidas invernales”** anormales de colonias (Currie et al. 2010; Genersch et al. 2010; Hatjina et al. 2010; Potts et al. 2010b; van der Zee et al. 2012), sin que se llegue a observar la sintomatología típica del SDC. Aunque diferenciados, ambos fenómenos comparten que las pérdidas de colonias usualmente no se atribuyen a ninguna enfermedad conocida o no se aprecia una sintomatología compatible con las enfermedades descritas hasta el momento, por lo que en muchas ocasiones se han considerado como el mismo fenómeno. Se han notificado casos de pérdidas invernales anormales especialmente desde la temporada 2002/2003, con casos en localizaciones tan remotas como Canadá (Currie et al. 2010) y Alemania (Genersch et al. 2010). En el caso de España se observaron tanto altas mortandades de colonias como despoblamiento de las colmenas durante la temporada 2004/2005 (Higes et al. 2005; Pajuelo. 2005), aunque en los años sucesivos sólo se han notificado casos esporádicos a falta de encuestas a nivel nacional. Recientemente un estudio pan-europeo ha estimado que en Europa sigue habiendo pérdidas invernales del 30% en

algunas regiones, aunque en España se ha estimado que en 2012-2013 las pérdidas fueron del 9.5% de las colonias (Chauzat et al. 2014).

3.1. Causas de la pérdida de colmenas

Son muchas las causas que se han barajado para explicar estas pérdidas inusuales, tanto de naturaleza abiótica como biótica, si bien ninguno de ellos ha sido reconocido como el único responsable. En cambio, el resultado de numerosos estudios parece indicar que se trata de un **problema multifactorial** en el que varios factores interactúan produciendo el colapso de la colonia, destacando especialmente los patógenos como agentes principales de este fenómeno. A continuación se revisan los principales factores que han sido estudiados en relación a la pérdida de colmenas.

3.1.1. *Clima*

Debido a las características de la producción apícola, el clima tiene un claro efecto sobre las colonias, e influye en ellas tanto de manera directa como indirecta (VanEngelsdorp y Meixner, 2010). La temperatura ambiente influye directamente en las colonias, ya que cambios bruscos de temperatura o temperaturas extremas obligan a las colonias a realizar sobreesfuerzos para regular la temperatura del interior de la colmena. Por ejemplo, temperaturas muy bajas en poblaciones pequeñas pueden producir el enfriamiento de la cría. En cambio, las altas temperaturas favorecen el aumento de la productividad de la colonia porque reduce la demanda metabólica de las abejas pecoreadoras (Harrison y Fewell, 2002). Además, el clima influye indirectamente en la colonia al tener un efecto en la disponibilidad de recursos en los alrededores de la misma. De este modo, en temporadas de escasez de lluvia y bajas temperaturas, disminuye la producción de néctar en las plantas, lo que limita las reservas alimenticias de las colonias. Por otro lado, el cambio climático en el área mediterránea hace que las precipitaciones sean más escasas y las temperaturas más elevadas. Este hecho puede estar teniendo un efecto en la disponibilidad de recursos debido al agotamiento de las floraciones, que cada vez son más cortas. Además, se ha comprobado que factores como la temperatura y humedad favorecen la proliferación de patógenos como *Varroa destructor* (Harris et al. 2003) y hongos (Bailey y Ball, 1991).

3.1.2. Nutrición inadecuada

La mala nutrición es una de las principales causas de muerte en invierno aunque puede observarse igualmente durante el resto del año. Se produce fundamentalmente cuando el recurso natural escasea y las abejas comienzan la hibernación con recursos insuficientes. Las abejas aparecen muertas en el interior de la colmena y muchas de ellas metidas en las celdillas. Por tanto, la revisión periódica de las colonias es fundamental para asegurar que las reservas son suficientes, especialmente de cara al invierno, de lo contrario es necesario suplementar las colonias. Además de cantidad, es necesario que las abejas tengan alimento de calidad. Se ha descrito que las abejas necesitan de una proporción determinada de aminoácidos para alimentarse (de Groot. 1953). La proliferación de monocultivos y el auge de la trashumancia de colmenas para polinizarlos ha producido que muchas colonias tengan una dieta pobre que puede tener un efecto negativo en su salud, como los que ya han sido descritos sobre su sistema inmune (Alaux et al. 2010). Por otro lado, la pérdida de hábitats naturales y la fragmentación del territorio, factores cada vez más frecuentes hoy en día, también determinan una menor disponibilidad de recursos para las colmenas, ya que reducen el área de pecoreo efectiva de una colonia.

3.1.3. Pesticidas y contaminantes ambientales

La agricultura moderna requiere del uso de productos químicos tales como insecticidas, fungicidas y herbicidas para evitar las plagas que afectan a los cultivos y así aumentar los rendimientos de los mismos. Las abejas quedan expuestas a estos productos debido a su actividad de pecoreo si el colmenar se sitúa en las proximidades. Se han estudiado los efectos de distintos compuestos sobre las abejas y especialmente el de los **neonicotinoides**, que son los que han demostrado un mayor efecto sobre las colmenas. Aunque en ocasiones los efectos pueden ser agudos, con gran mortalidad de colmenas, los efectos más graves son los crónicos o sub-letales entre los que se encuentran parálisis, desorientación y cambios de comportamiento (Desneux et al. 2007). Tales efectos han llevado a realizar minuciosos estudios de riesgo asociado a los pesticidas por parte de la EFSA (EFSA. 2012a; EFSA. 2012b), lo que derivó en 2013 en la prohibición del uso durante dos años de tres neonicotinoides: clotianidina, tiametoxam e imidacloprid.

Otras causas que potencialmente pueden contribuir a la pérdida de colonias están también relacionadas con el entorno y las condiciones de manejo de las mismas: los cultivos de organismos modificados genéticamente (OMG), las radiaciones electromagnéticas y la presencia de residuos de tratamientos sanitarios. Aunque

inicialmente se asume que la presencia de OMG con insecticidas podría tener un efecto negativo sub-letal sobre la colmena, este hecho aún no ha podido ser demostrado (Rose et al. 2007). Igualmente, las radiaciones electromagnéticas podrían tener un efecto adverso sobre la orientación de las abejas (Kimmel et al. 2007), pero ningún estudio ha cuantificado la magnitud de este daño. Por último, se ha visto que los compuestos empleados en el tratamiento sanitario contra el ácaro *Varroa destructor* se acumulan en la colmena, especialmente en la cera (Bogdanov. 2006; VanEngelsdorp y Meixner, 2010). Sin embargo, se requieren estudios en los que se verifique el efecto a largo plazo sobre las colonias (Desneux et al. 2007; VanEngelsdorp y Meixner, 2010).

3.1.4. Depredadores

Abejaruco. Se conoce como abejarucos a un grupo de 20 especies de aves que se alimentan de himenópteros venenosos como las abejas. En el caso de España la especie presente es *Merops apiaster*, una especie migratoria que pasa por nuestro país entre marzo-mayo y entre julio-septiembre. Los principales problemas que causa son por la aparición de colmenas zanganeras al ingerir la reina o dificultar su fecundación, y la disminución del pecoreo. Puesto que es una especie protegida, el principal mecanismo de defensa del apicultor es la prevención para programar los asentamientos y las actividades del colmenar (Puerta et al. 2001).

Avispones y *Vespa velutina*. Los avispones tienen a las abejas como parte de su dieta. En España la especie autóctona es la *Vespa crabro*, que aunque produce daño a las colonias habitualmente no suele causar grandes estragos. Sin embargo, la *Vespa velutina* se caracteriza por su mayor agresividad a las colonias. Se trata de una especie invasora procedente de Asia. Se introdujo en España a partir de 2010, al encontrarse los primeros casos en País Vasco. Se ha generado una gran alarma entre los apicultores ante la llegada de esta nueva especie y las potenciales repercusiones para las colonias, ya que un ataque intensivo (más de cinco avispones) debilita a las colonias y puede afectar a la entrada de polen (como el abejaruco), causando mortandad y enfermedades en la cría (Pajuelo. 2015).

3.1.5. Patógenos

Existe una gran variedad de patógenos que afectan a las abejas, incluyendo bacterias, hongos, parásitos y virus. Muchos de ellos se encuentran de forma habitual dentro de la colmena, por lo que requieren de otros factores para romper el equilibrio con el hospedador y tener un efecto negativo sobre las colonias. Esta presencia continua, unida

al hecho de que se han encontrado mayor cantidad de patógenos en las colmenas colapsadas (Cox-Foster et al. 2007), ha hecho que se consideren como un factor fundamental en la mortalidad de las colonias.

3.1.5.1. Bacterias

Aunque son varias las enfermedades bacterianas descritas (Bailey y Ball, 1991), aquellas de mayor relevancia para las colonias son las conocidas como “loques”. Las loques son dos enfermedades que afectan a la cría y están producidas por las bacterias *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius*. La primera de ellas es la causante de la loque americana, de mayor virulencia, que se da con mayor frecuencia en el continente europeo (Genersch. 2010). La segunda es la responsable de la loque europea, que causa enfermedad sobre todo en América. (Forsgren. 2010). Ambas enfermedades son altamente contagiosas, pasando de una colmena a otra por el uso de material apícola común, y presentan una sintomatología muy similar. Las loques afectan a la cría, a la que matan rápidamente en el interior de la celdilla. Se diagnostican visualmente por la apariencia amarillenta de la cría, que desprende un fuerte olor y si se intenta sacar forma un fino hilo característico (Figura 11). Son dos enfermedades notificables a la OIE debido a su carácter contagioso y a la dificultad de eliminación, ya que ambas bacterias son esporuladas y sus esporas sólo se pueden eliminar mediante altas temperaturas. Otras bacterias como las del género *Spiroplasma*, que habían sido consideradas como endosimbiontes de las abejas, se han relacionado con la pérdida de colmenas (Aebi y Neumann, 2011).



Figura 11. Colmena con loque. Se observa la viscosidad de las larvas muertas. Fuente: irishbeekeeping.ie

3.1.5.2. Hongos

3.1.5.2.1. *Ascosferosis o cría yesificada*

También conocida popularmente como “pollo escayolado” o “cría de tiza”, esta enfermedad está causada por el hongo *Ascosphaera apis* (Puerta et al. 1994). La enfermedad afecta sólo a la cría, donde el micelio prolifera matando a la cría en la celdilla, que aparece con consistencia algodonosa en un primer momento, para más tarde oscurecerse, dando la apariencia de “momias” (Figura 12). Las esporas se transmiten vía oral desde la nodriza a la larva y pueden contaminar igualmente el material apícola. Aunque no suele causar la muerte de toda la colonia, sí que produce disminución de los rendimientos de la colonia (Bailey, 1963; Flores et al. 2000). Es una enfermedad que aparece de manera típica ante situaciones de estrés de la colmena, tales como temperaturas frías, exceso de humedad y alta carga de patógenos como *Varroa* (Puerta et al. 1994; Flores et al. 1996; VanEngelsdorp y Meixner, 2010). También se ha asociado a situaciones de inmunosupresión (Glinski y Buczek, 2003; Aronstein y Murray, 2010).



Figura 12. Detalle de estadios larvarios afectados por la ascosferosis, popularmente conocidos como “momias”. Fuente: license.umn.edu.

3.1.5.2.2. *Hongos parásitos: nosemosis*

La nosemosis es una enfermedad producida por microsporidios (hongos parásitos intracelulares) del género *Nosema*. Las dos especies que afectan a las abejas son *Nosema apis* y *Nosema ceranae* (Figura 13). *Nosema apis* es la especie que infecta naturalmente *Apis mellifera*, por lo que era un patógeno conocido en la apicultura, y hasta hace 20 años se encontraba

en altas prevalencias tanto en Europa como en América. Sin embargo, *Nosema ceranae*, la especie que infecta normalmente a la abeja asiática, *Apis cerana*, se ha expandido recientemente por las colonias de *Apis mellifera* en detrimento de *Nosema apis* (Paxton et al. 2007; Fries. 2010). Las infecciones por *Nosema* se transmiten horizontalmente entre las abejas por ruta fecal-oral, por la ingestión de esporas presentes en la colmena. Las esporas germinan en el ventrículo y produce inflamación y daño en las células epiteliales del intestino. La sintomatología más observada es la presencia de heces diarreicas en las piqueras (acceso) de las colmenas. Sin embargo su mayor efecto en la colmena es la reducción del tiempo de vida de las abejas, la disminución de la productividad de la colmena y el aumento de la mortalidad en invierno (Fries et al. 1984). Además *Nosema ceranae* ha sido descrito como el causante de pérdidas invernales en España poco después de su detección por primera vez en 2006 (Higes et al. 2006; Higes et al. 2008; Higes et al. 2009). Sin embargo existe controversia sobre su papel real en este fenómeno ya que se ha descrito que la presencia de estos microsporidios es también frecuente en colonias sanas sin que se haya relacionado con pérdidas de colmenas (Siede et al. 2008; Chen et al. 2008; Invernizzi et al. 2009; Fries. 2010; Fernandez et al. 2012).

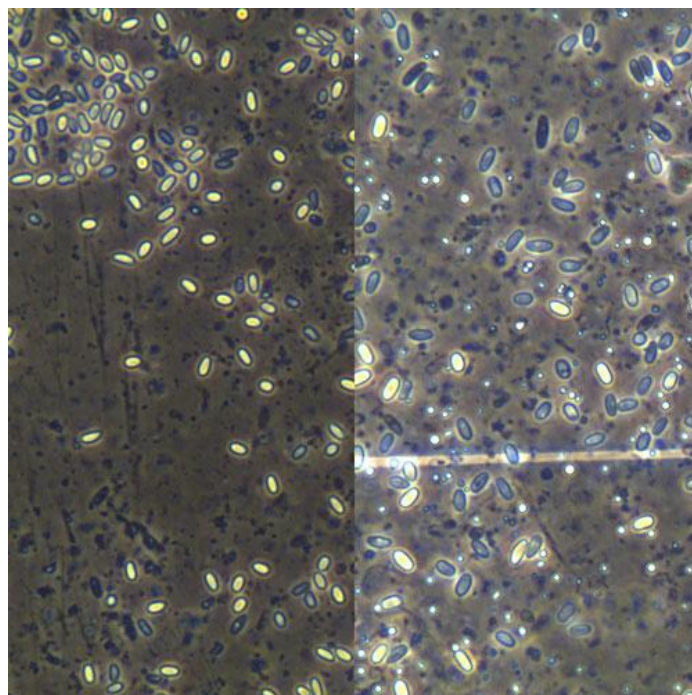


Figura 13. Esporas de *Nosema ceranae* (izquierda) y *Nosema apis* (derecha) usando el mismo aumento (400x) en un microscopio compuesto. Fuente: extensión.org.

3.1.5.3. Parásitos

3.1.5.3.1. *Acarapisosis, aethinosis y tropilaelapsosis*

Son tres enfermedades clasificadas como de declaración obligatoria para la OIE y están producidas por los ácaros *Acarapis woodi*, *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp* (Figura 14). En el caso de la acarapisosis, se trata de un ácaro que se localiza en las tráqueas de las abejas y se alimenta de su hemolinfa, debilitando a la abeja, que puede perder la capacidad de volar e incluso morir (Bailey. 1968). *Aethina tumida*, llamado el “escarabajo de las colmenas”, es una especie africana que invade las colmenas produciendo graves daños en las abejas. Aunque actualmente no se encuentra en España, en Europa se ha detectado un brote en Portugal en 2004 y recientemente en Italia en 2014 (OIE. 2015b). *Tropilaelaps* se alimenta de la hemolinfa de las abejas produciendo malformaciones y hasta el 50% de mortalidad en larvas (OIE. 2015a).



Figura 14. Imágenes de *Acarapis woodi* (izquierda), *Aethina tumida* (centro) y *Tropilaelaps clareae* (derecha). Fuente: National Bee Unit, ntnemdept.ufl.edu y USDA.

3.1.5.3.2. *Varroosis*

La varroosis es una enfermedad causada por el ácaro *Varroa destructor* (Figura 15). *Varroa* es un parásito originario de la abeja asiática *Apis cerana*, que probablemente pasó a ser un parásito de la abeja europea *Apis mellifera* en la primera mitad del siglo pasado, cuando las colonias de ambas especies coexistieron en el Este de Rusia y en Oriente (Rosenkranz et al. 2010). Desde este “salto” de hospedador *Varroa* rápidamente se extendió por colonias de *Apis mellifera* por todo el mundo, llegando a Europa a mediados de los años 70 (Alemania, 1977) y concretamente a España en 1985 (Pajuelo et al. 1988). Recientemente se ha descrito su aparición en Nueva Zelanda en 2000 (Mondet et al. 2014) y Hawái en 2007 (Martin et al. 2012), no existiendo registros de su presencia en las colonias de *Apis mellifera* de Australia, que constituye el último gran territorio donde *Varroa* sigue ausente.

Desde la llegada de *Varroa* a las colonias de *Apis mellifera* el impacto en la apicultura ha sido dramático. En los primeros años de su expansión por las colonias de la abeja europea, millones de colonias colapsaron, llegando a eliminar el 40% de la cabaña apícola en España (Llorente. 2003) y llevando a casi la total desaparición de los enjambres silvestres de *Apis mellifera* (Thompson et al., 2014). Por este motivo, el control de *Varroa* requirió de la implantación de tratamientos acaricidas regulares que controlan la población. A pesar de estos tratamientos, *Varroa* se ha relacionado con el colapso de colonias en numerosos estudios, la mayoría de ellos en asociación con virus como DWV y ABPV (Martin. 2001; Sumpter y Martin, 2004; Martin et al. 2012; Schroeder y Martin, 2012).

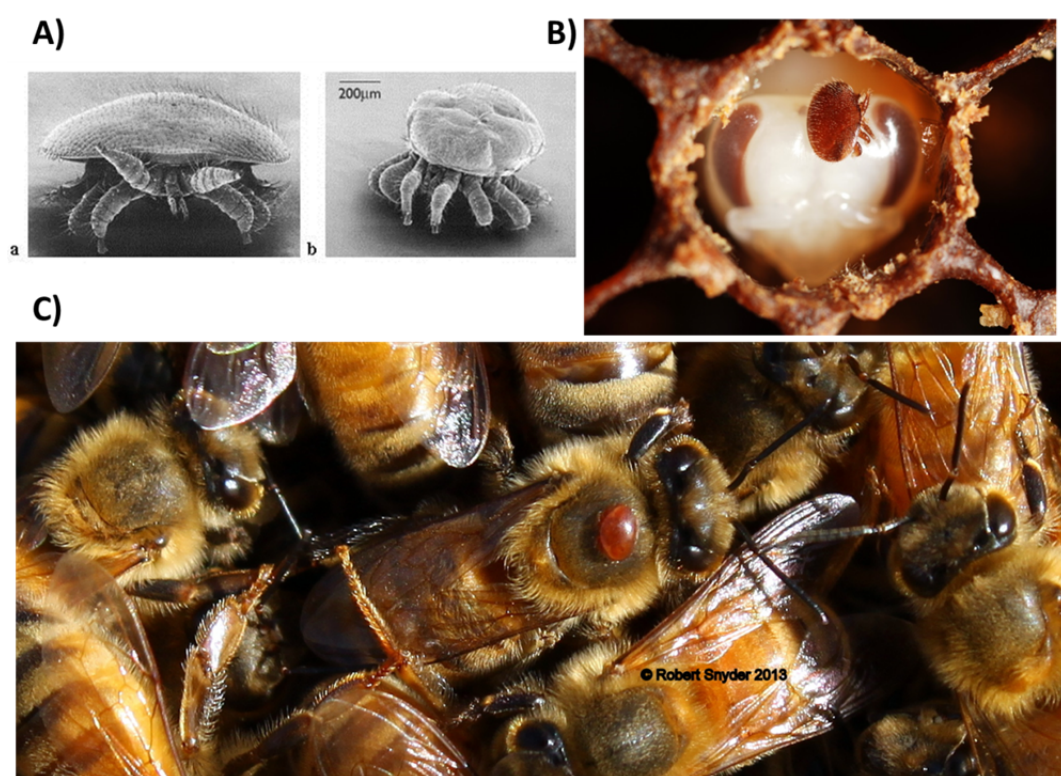


Figura 15. Imágenes de *Varroa destructor*. A) Hembra (a) y macho (b) de *Varroa destructor* en el microscopio electrónico, B) *Varroa* sobre una ninfa en el interior de la celdilla y C) *Varroa* sobre una abeja obrera adulta. Fuente: Elaboración propia a partir de chdphd.com, wikimedia.org y Robert Snider (2013).

Patología

A diferencia de en *Apis cerana*, en la que el equilibrio parásito-hospedador ha sido alcanzado tras una co-evolución, en *Apis mellifera* no existe una relación parásito-hospedador estable (Rosenkranz et al. 2010). El corto periodo de co-evolución que presentan se traduce en que el ácaro ejerce un efecto patógeno sobre la abeja europea.

Daños directos por Varroa. Varroa causa daño a nivel individual ya que se alimenta de la hemolinfa de las abejas, especialmente de larvas y pupas que constituyen los estadios más susceptibles al ácaro debido a que se reproduce en el interior de las celdillas de cría. Además, Varroa produce un efecto inmunodepresor (Yang y Cox-Foster, 2005), lo que lleva a que otros organismos oportunistas puedan también causar daños en las colonias afectadas.

Daños indirectos como vector de virus. Por otro lado, Varroa actúa como vector de varios virus de las abejas, pudiendo dar lugar a una sintomatología en la cría asociada a la acción conjunta de Varroa y de los virus conocida como el “Síndrome del ácaro parásito”, y que se caracteriza por la mortalidad de la cría en la celda, la aparición de orificios en los opérculos para que la cría muerta sea retirada, y la presencia de abejas adultas con alas y extremidades deformadas (Shimanuki et al. 1994). Actualmente se conocen 24 virus diferentes que afectan a las abejas, y muchos de los más patógenos se transmiten a través del ácaro, incluyendo el virus de la cría ensacada (SBV), el complejo formado por el virus de la parálisis aguda (ABPV), el virus de la parálisis aguda Israelí (IAPV) y el virus Kashmir (KBV) y el complejo formado por el virus de las alas deformadas (DWV) y el virus Varroa destructor-1 (VDV-1). Sin embargo, Varroa puede actuar de tres modos diferentes con respecto a la transmisión de virus:

- **Vector mecánico.** El contacto directo entre la abeja y el ácaro al alimentarse permite que el ácaro adquiera los virus a través de la hemolinfa. El ácaro, a su vez, puede transmitir los virus a otras abejas adultas y larvas al cambiar de hospedador para alimentarse o al entrar en las celdillas de cría para reproducirse. Ésta es una de las formas por la que los virus del complejo ABPV-IAPV-KBV, así como SBV se pueden transmitir en la colonia (Chen et al. 2004a; Shen et al. 2005b; Di Prisco et al. 2011).
- **Vector biológico.** Los virus DWV y VDV-1 no sólo se transmiten de manera mecánica a través del ácaro, sino que también se replican en él amplificando la infección al transmitir altas cargas de virus al nuevo hospedador (Ongus et al. 2004; Yue y Genersch, 2005).
- **Activador de infecciones virales persistentes.** La actividad inmunosupresora de Varroa (Yang y Cox-Foster, 2005) hace que se active la replicación de virus que se encuentran en niveles bajos, pudiendo dar lugar a síntomas en la colonia. Concretamente, se ha descrito que en el caso de DWV, la replicación se activa

al reducirse la expresión de la ruta NF-kB (Nazzi et al. 2012), entre otros mecanismos actualmente en estudio.

3.1.5.4. Protozoos

Crithidia mellificae es un tripanosoma que ha sido descrito como predictor de la mortalidad de colonias en invierno junto con *Nosema ceranae* (Ravoet et al. 2013). *Malpighamoeba mellificae* es un protozoo parásito de las abejas.

3.1.5.5. Virus

Los virus de abejas serán tratados en profundidad en el siguiente epígrafe.

3.1.5.6. Relación entre todas las posibles causas

Las colonias de abejas *Apis mellifera* son organismos complejos, en los que el mantenimiento del estatus sanitario depende no sólo de un equilibrio a nivel individual de cada abeja, sino de un equilibrio global al nivel de toda la colonia. Los agentes que pueden afectar a las abejas son numerosos y de distinta naturaleza y todos ellos pueden individualmente llevar a la colonia al colapso cuando se encuentran en suficiente grado. Sin embargo, ninguno de estos agentes ha podido explicar por sí solo el colapso de colonias a gran escala que se ha venido observando en los últimos años. Todo apunta a que se trata de un fenómeno **multifactorial**, en el que la aparición de nuevos factores o la combinación de unos factores con otros, a los que denominaremos “factores de riesgo”, pueden llevar a la colonia desde un estado sano a un estado patológico, que puede ser aprovechado por infecciones oportunistas o asintomáticas ya presentes en la colmena para producir daño e incluso la muerte. El estado próximo a la enfermedad que presenta una colonia, o las abejas individuales, por la confluencia de factores internos y externos se define como “estrés”.

Por ello, se hace necesario descubrir tanto los factores de riesgo que pueden inducir “estrés” en la colmena, como establecer la dinámica de los patógenos presentes en la misma, especialmente los virus, debido a que bajo las condiciones adecuadas pueden pasar de una infección asintomática a una activación de su replicación que puede llegar a colapsar la colmena. Además, es igualmente necesario conocer el papel que juega el sistema inmune, tanto a nivel individual como a nivel global de la colmena (inmunidad social), para así identificar los mecanismos de interacción hospedador-patógenos- ambiente que son responsables de la pérdida de colmenas (Figura 16).

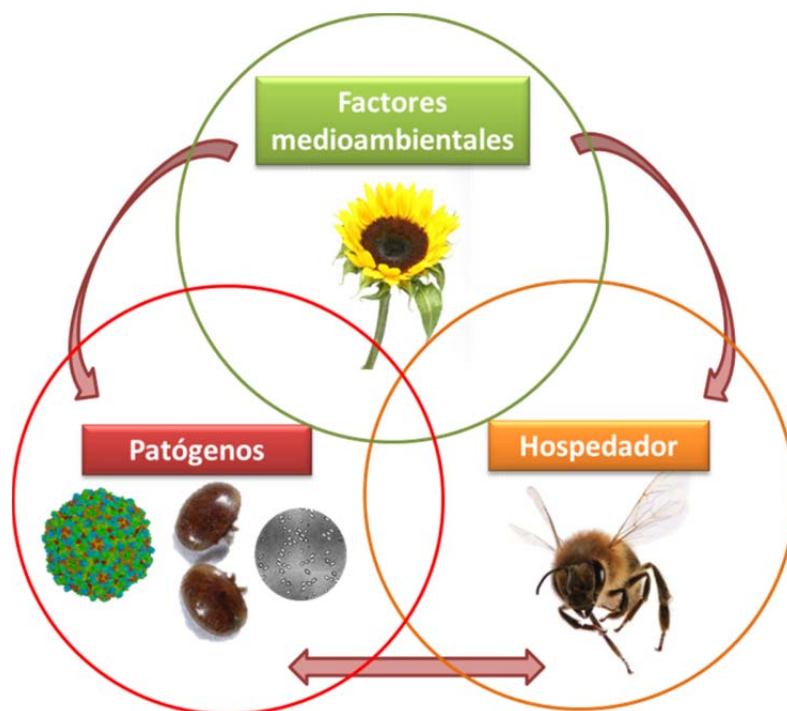


Figura 16. Triángulo de relación entre la abeja (hospedador), los patógenos de la abeja y el medio ambiente de la colonia. Fuente: elaboración propia.

4. ENFERMEDADES VÍRICAS

Dentro de todos los patógenos que potencialmente pueden alterar el equilibrio patógeno-hospedador en la colmena, destacan los virus por varias razones. En primer lugar, son los patógenos menos conocidos de las abejas, pues se empezaron a describir a partir de los años 60, aunque ya se tuvo constancia de algunos síntomas víricos como parálisis e incapacidad para volar desde principios del siglo XX (Neumann y Carreck, 2010). Además se caracterizan porque la mayoría de ellos están presentes en las colmenas sin producir sintomatología, y cuando producen sintomatología suele ser inespecífica y difícil de apreciar, como por ejemplo el acortamiento de la vida de la abeja, por lo que su diagnóstico en la colmena es complicado. Por otro lado, se propagan mediante numerosas rutas de transmisión, algunas de ellas incluyendo otros patógenos como Varroa y Nosema, con los que interactúan. Además, estos virus no se multiplican en los cultivos celulares establecidos, lo que hace difícil estudiar su efecto patógeno. Por último, suelen encontrarse coinfecciones víricas en una misma colmena, por lo que es difícil atribuir los síntomas observados en la colonia a un sólo virus. Estas características han hecho que los virus sean una de las causas que más atención han suscitado en las investigaciones llevadas a cabo en las pérdidas de colonias a gran escala e incluso se les ha relacionado directamente con la

pérdida de colmenas (Highfield et al. 2009; Genersch y Aubert, 2010; Pohorecka et al. 2011; Schroeder y Martin, 2012). Por tanto, los virus de abeja son una pieza clave en el estudio del colapso de colonias.

4.1. Taxonomía y genoma

En la actualidad se conocen 24 virus distintos que afectan a las abejas *Apis mellifera* (Tabla 1). La mayoría de ellos son virus ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, forma icosaédrica y pequeño tamaño (17-35 nm), excepto el virus filamentoso (AmFV) y el virus iridiscente (AIV), de mayor tamaño (150 nm) y genoma compuesto de ADN de doble cadena. La mayoría de estos virus fueron descubiertos entre los años 60 y 80 (Bailey y Ball, 1991) mediante técnicas “clásicas” como microscopía o serología (ELISA, WB, AGID). Sin embargo, los últimos descubrimientos de virus se han realizado mediante secuenciación a gran escala de extractos de ARN y ADN de abeja, pudiendo existir un solapamiento entre los virus descritos de forma clásica y las nuevas secuencias. Existen varios virus de gran similitud, por lo que se incluyen dentro de “complejos” como el formado por ABPV-IAPV-KBV, DWV-VDV-1-Virus Egipcio (EV), SBV-SBV tailandés (TSBV), virus X de la abeja (BVX)-virus Y de la abeja (BYV) y virus del lago Sinaí 1 (LSV-1)-virus del lago Sinaí-2 (LSV-2). Por tanto, el número de virus “reales” se reduce a unos 16-18 virus de abejas.

La mayoría de virus que afectan a las abejas pertenecen al orden *Picornavirales* y se distribuyen en dos familias: *Dicistroviridae* e *Iflaviridae*. Dentro de la familia *Dicistroviridae* existen dos géneros, el género *Aparavirus*, que engloba a las especies ABPV, KBV e IAPV, así como otros tres virus de invertebrados, y el género *Cripavirus*, que contiene dos virus que afectan a las abejas: el virus de la parálisis letal de los ápidos (ALPV) y el virus de la realera negra (BQCV). La familia *Iflaviridae* contiene un solo género, *Iflavirus*, que engloba nueve especies entre las que se encuentran los virus DWV, VDV-1, SBV y el virus de la parálisis lenta de la abeja (SBPV) (ICTV. 2014).

Tabla 1. Características de los virus de abejas. Adaptado de de Miranda et al., 2011. * Predicción del genoma. Tamaño de las proteínas calculado mediante SDS-PAGE.

PROPIEDADES FÍSICAS							
VIRUS		FORMA	TAMAÑO	PROT. CÁPSIDE	ÁCIDO NUCLEICO	TAMAÑO GENOMA	TAXONOMÍA
Virus de la parálisis aguda	ABPV	Icosaédrico	30nm	35-9-33-24kDa	ssRNA	~9.5kb	<i>Dicistroviridae</i>
Virus Kashmir	KBV	Icosaédrico	30nm	37-6-34-25kDa	ssRNA	~9.5kb	<i>Dicistroviridae</i>
Virus de la parálisis aguda israelí	IAPV	Icosaédrico	30nm	35-7-33-26kDa	ssRNA	~9.5kb	<i>Dicistroviridae</i>
Virus de la realera negra	BQCV	Icosaédrico	30nm	31-14-29-30kDa	ssRNA	~9.5kb	<i>Dicistroviridae</i>
Virus de la parálisis letal de los ápidos	ALPV	Icosaédrico	30nm	25-7-32-28kDa*	ssRNA	~10kb	<i>Dicistroviridae</i>
Virus Big Sioux River	BSRV	Icosaédrico	30nm	28-5-29-30kDa	ssRNA	~10kb	<i>Dicistroviridae</i>
Virus de las alas deformadas	DWV	Icosaédrico	30nm	32-2-44-28kDa	ssRNA	~10kb	<i>Iflaviridae</i>
Virus Varroa destructor-1	VDV-1	Icosaédrico	30nm	32-2-46-28kDa	ssRNA	~10kb	<i>Iflaviridae</i>
Virus egipcio	EBV	Icosaédrico	30nm	30-2-41-25kDa	ssRNA	?	<i>Iflaviridae</i>
Virus de la cría sacciforme	SBV	Icosaédrico	30nm	31-2-32-30kDa	ssRNA	~9kb	<i>Iflaviridae</i>
Virus de la cría sacciforme tailandés/chino	TSBV	Icosaédrico	30nm	31-2-32-30kDa	ssRNA	~9kb	<i>Iflaviridae</i>
Virus de la parálisis lenta	SBPV	Icosaédrico	30nm	27-2-46-29kDa	ssRNA	~9.5kb	<i>Iflaviridae</i>
Virus de la parálisis crónica	CBPV	Anisométrico	30~60nm	23- (30/50/75?) kDa	ssRNA	~2.3kb/~3.7 kb	Sin clasificar
Virus satélite de la parálisis crónica	CBPSV	Icosaédrico	17nm	15kDa	ssRNA	(3x)~1.1kb	Satélite
Virus de las alas opacas	CWV	Icosaédrico	17nm	19kDa	ssRNA	~1.4kb	?
Virus X	BVX	Icosaédrico	35nm	52kDa	ssRNA	?	?
Virus Y	BVY	Icosaédrico	35nm	50kDa	ssRNA	?	?
Virus del lago Sinaí 1	LSV-1	?	?	63kDa*	ssRNA	~5.5kb	Sin clasificar
Virus del lago Sinaí 2	LSV-2	?	?	57kDa*	ssRNA	~5.5kb	Sin clasificar
Virus Arkansas	ABV	Icosaédrico	30nm	43kDa	ssRNA	~5.6kb	?
Virus Berkeley similar a picornavirus	BBPV	Icosaédrico	30nm	37-?-35-32kDa	ssRNA	~9kb	?
Virus Varroa destructor similar al virus Macula	VdMLV	Icosaédrico	30nm	24kDa*	ssRNA	~7kb	<i>Tymoviridae</i>
Virus filamentoso	AmFV	Filamentoso	150x450nm	12x(13~70k Da)	dsDNA	?	<i>Baculoviridae</i>
Virus iridiscente	AIV	Poliédrico	150nm	?	dsDNA	?	<i>Iridoviridae</i>

Sin embargo, algunos virus aún permanecen sin asignarse a ningún género y por tanto, se consideran como “no clasificados”. Entre los virus no clasificados se encuentran los LSV-1 y LSV-2, así como el virus de la parálisis crónica (CBPV).

Esta clasificación taxonómica responde a la organización del genoma de cada una de las familias de virus de abeja (Figura 17)(Carter y Genersch, 2008). Debido a su importancia, pasamos a describir únicamente la estructura de las siguientes familias:

Dicistrovirus. Los virus incluidos dentro de la familia *Dicistroviridae* tienen un genoma distribuido en dos marcos de lectura abiertos u “open reading frame” (ORF). El ORF 1, situado en el extremo 5', codifica las proteínas no estructurales, tales como la helicasa, la proteasa y la polimerasa ARN dependiente de ARN (RdRp). El ORF 2 codifica las proteínas víricas estructurales (VP). Ambos ORF se separan por un Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES).

Iflavirus. Los virus de la familia *Iflaviridae*, en cambio, tienen su genoma organizado en un único ORF, donde el extremo 5' codifica para las proteínas estructurales, mientras que el extremo 3' codifica para las proteínas no estructurales.

Los genomas de ambas familias comienzan en el extremo 5' con una proteína enlazada de forma covalente (VPg) y una cola de poliA en el extremo 3'.

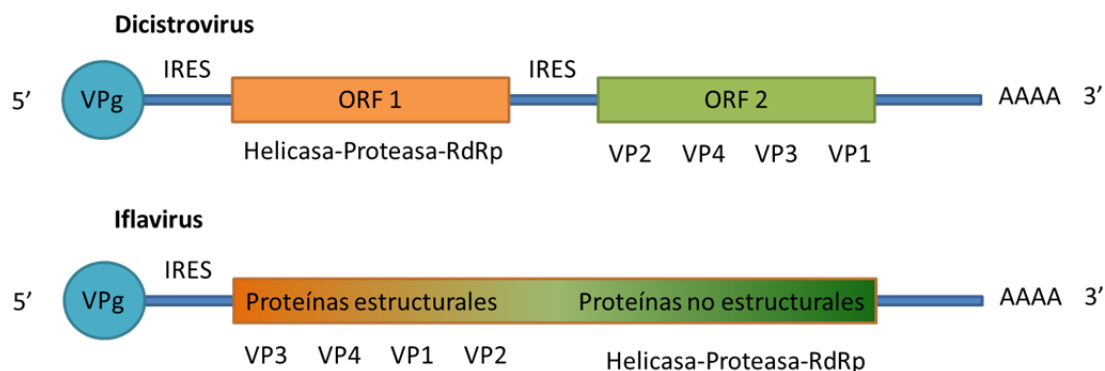


Figura 17. Esquema del genoma de los virus de las familias *Dicistroviridae* e *Iflaviridae*. Elaboración propia a partir de Carter y Genersch (2008).

En cambio, CBPV dispone de siete ORFs distribuidos en dos hebras de ARN (ARN1 y ARN2), lo que le diferencia ampliamente del resto de virus clasificados.

4.2. Tipos de infección vírica

Ya que los virus de abeja no se replican en modelos de cultivos celulares (*in vitro*), y por tanto no se puede estudiar el efecto directo sobre la célula hospedadora, la clasificación clásica de infección lítica, infección latente e infección persistente que se aplica a otros virus no se puede aplicar de la misma manera a los virus de abeja. En su lugar, las infecciones víricas se clasifican mediante dos términos que describen la forma de actuar de estos virus: infecciones “aparentes” (“overt” infection) e infecciones “encubiertas” (“covert” infection) (Tabla 2). La infección aparente se caracteriza porque el hospedador infectado con el virus desarrolla síntomas de enfermedad evidentes. En cambio, la infección encubierta se caracteriza porque son asintomáticas, es decir, el hospedador infectado con el virus no desarrolla síntomas de enfermedad evidentes.

Tabla 2. Tipos de infección vírica en insectos. Adaptación a partir de Hails et al. (2008).

Tipo de infección	Sub-tipo	Partículas víricas detectables	Síntomas evidentes de enfermedad	Expresión de genes víricos	Impacto en el estado físico del hospedador	Transmisión vertical	Duración
Aparente	Aguda	Sí	Sí	Completa	Alta	No	Corta
	Crónica	Sí	Sí	Completa	Alta	No	Larga
Encubierta	Persistente	Sí	No	Completa (menor expresión?)	Baja	Sí	Larga
	Latente	No	No	Mínima y específica	Baja	Sí	Larga

Infección aparente. Cuando la infección vírica produce gran cantidad de partículas víricas y el hospedador muestra síntomas evidentes de enfermedad como resultado de la infección (relación causal). La transmisión es fundamentalmente horizontal, los síntomas son visibles en distintos grados y el patógeno tiene un impacto evidente en el estado físico del hospedador. La duración de la infección hace que se distinga entre infección aguda e infección crónica.

Infección encubierta. Se caracteriza por la ausencia de síntomas, aunque puede suponer un coste en el estado físico del hospedador. A diferencia de las infecciones “inaparentes”, que son de corta duración, en las infecciones encubiertas los virus se transmiten de manera vertical, durante varias generaciones. Pueden dar lugar a brotes de enfermedad con sintomatología evidente bajo la influencia de varios factores medioambientales y de la colonia. Las infecciones encubiertas pueden ser latentes o

persistentes, aunque en el caso de los virus de abeja no se ha podido demostrar ninguna infección latente real. La infección persistente se caracteriza por la producción constante pero a bajos niveles de partículas víricas en hospedador.

La infección más frecuente de los virus de abejas es la **infección encubierta persistente**, en el que los virus no producen un daño apreciable para el hospedador, pero continúan replicándose a baja escala y prolongándose a través de las generaciones. La infección persistente supone un equilibrio entre el hospedador y el virus a través de la interacción entre el virus, la célula hospedadora y el sistema inmune del hospedador. De hecho, la persistencia del virus en la abeja implica la evasión de los mecanismos de vigilancia del sistema inmune de la abeja (Hails et al. 2008).

En resumen, estas infecciones persistentes tienen especial importancia en las colonias de abejas ya que la replicación a baja escala produce la alteración de la homeostasis normal del hospedador suponiendo un coste en su estado físico, pero sin destruir la célula infectada ni matar a la abeja. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias, como la influencia de factores de riesgo mencionados previamente, puede desencadenarse una infección aparente con sintomatología evidente que puede suponer el colapso de la colmena.

4.3. Características específicas de los virus de abeja

Aunque son numerosos los virus descritos en *Apis mellifera*, algunos de ellos destacan por su amplia distribución o por el efecto patógeno que pueden causar en las colonias infectadas. A continuación se describen las características de los virus más importantes de la abeja.

4.3.1. Virus de la parálisis aguda (ABPV)

El virus ABPV fue descrito junto con CBPV en 1963 cuando se intentaba descubrir el agente causante de la parálisis de las abejas (Bailey et al. 1963). Su hospedador principal (y probablemente el original) es *Apis mellifera*, aunque se ha detectado en cinco especies de abejorros (Ribiere et al. 2008). Junto con KBV e IAPV se considera uno de los virus más virulentos, pues la inyección de menos de 100 partículas víricas producen la muerte de individuos en pocos días, aunque requiere dosis más altas por vía oral (de Miranda et al. 2010a).

Distribución y estacionalidad. ABPV se distribuye prácticamente de manera mundial, aunque se ha descrito mayor presencia en Europa (Gauthier et al. 2007; Nielsen et al. 2008) y Sudamérica (Teixeira et al. 2008). A pesar de su amplia distribución se encuentra en prevalencias bajas. La prevalencia y carga de ABPV en las colmenas aumenta a lo largo de la estación, con pico a finales de verano (Gauthier et al. 2007).

Transmisión y patogenicidad. Antes de la llegada de Varroa a las colmenas de *Apis mellifera*, ABPV se encontraba en infecciones encubiertas en la colonia y cargas virales bajas, como la mayoría de los dicistrovirus. En la infección encubierta ABPV se transmite vía fecal-oral a través de las secreciones de la glándula salivar de las abejas adultas y el alimento. Además, se transmite de manera vertical, pues se ha detectado tanto en ovarios como en semen (Yue et al. 2006; de Miranda et al. 2013). Sin embargo, con la aparición de Varroa, que transmite este virus cuando regurgita la hemolinfa cada vez que cambia de hospedador para alimentarse, se han detectado grandes cantidades de ABPV tanto en adultos como en cría de colonias colapsadas. A pesar de que infecta todos los estadios de la vida de la abeja, sólo se aprecia sintomatología en abejas adultas. La sintomatología aguda que produce es temblores en alas y cuerpo y parálisis progresiva en 2-4 días, incapacidad para volar, oscurecimiento y pérdida de pelo y muerte en uno o dos días cuando se infectan abejas adultas en el laboratorio (Bailey et al. 1964a).

ABPV se ha relacionado junto con Varroa en la pérdida de colmenas en Europa durante los años 80 y 90 (Allen et al. 1986; Ball y Allen, 1988; Bailey y Ball, 1991; Faucon et al. 1992; Bekesi et al. 1999; Berenyi et al. 2006).

4.3.2. *Virus Kashmir (KBV)*

El virus KBV fue descubierto en 1974 en abejas asiáticas *Apis cerana* de la región de Cachemira (Bailey y Woods, 1977), pero infecta también a *Apis mellifera* y se ha detectado en abejorros de Nueva Zelanda y avispa de Australia (Anderson. 1991).

Distribución y estacionalidad. Al igual que ABPV, KBV se distribuye mundialmente y tiene mayor presencia en Norte América (Cox-Foster et al. 2007) y Nueva Zelanda (Todd et al. 2007). También aumenta su prevalencia y carga a lo largo del verano, pero su pico se da más tarde, en otoño (Gauthier et al. 2007).

Transmisión y patogenicidad. KBV es un virus muy virulento que se transmite de manera similar a ABPV. En ausencia de Varroa causa infecciones encubiertas con baja carga vírica, que se transmiten horizontalmente vía fecal-oral y vía transovárica (Shen et al. 2005b). Sin

embargo, en presencia de Varroa puede producir infecciones aparentes en las que producen la muerte de abejas adultas y cría, sin observarse sintomatología de parálisis, a diferencia de ABPV e IAPV. Además, se considera que la transmisión de KBV está fuertemente ligada a Varroa ya que se ha descrito que al alimentarse en la abeja inocular sustancias inmunodepresoras, activando la replicación del virus.

KBV también se ha relacionado con la pérdida de colonias junto con Varroa (Bailey et al. 1979; Todd et al. 2007; Ribiere et al. 2008).

4.3.3. Virus de la parálisis aguda israelí (IAPV)

El virus IAPV fue descubierto recientemente (Maori et al. 2007a) aunque su relación filogenética con ABPV y KBV hace pensar que en estudios previos a su descubrimiento se clasificó como una variante de KBV. El único hospedador conocido de IAPV es *Apis mellifera* (Chen y Evans, 2007).

Distribución y estacionalidad. Al igual que ABPV y KBV, IAPV se distribuye mundialmente, aunque tiene mayor presencia en el Medio-Este, Australia y Europa occidental (Maori et al. 2007a; Palacios et al. 2008; Kukiela y Sánchez-Vizcaíno, 2010). Su prevalencia y carga también aumentan a lo largo del año pero no presenta un pico marcado, observándose una mayor presencia del virus en verano y otoño.

Transmisión y patogenicidad. IAPV se transmite de manera similar a ABPV y KBV, de forma horizontal, por vía fecal-oral, y de forma transovárica en ausencia de Varroa, por lo que se mantiene en bajos niveles en infecciones encubiertas. En presencia del ácaro produce síntomas agudos en la colmena similares a los observados en ABPV, llegando a producir la muerte de los individuos adultos en pocos días.

La rápida mortalidad de la población adulta en la colmena provocada por ABPV, KBV e IAPV situó a estos tres virus como potenciales causantes del SDC, que se caracteriza por la presencia de cría desatendida y por la marcada ausencia de población adulta en la colmena. Un estudio realizado a gran escala en EEUU determinó que IAPV era un indicador de riesgo en el SDC (Cox-Foster et al. 2007). En Europa, un estudio anterior al SDC determinó que ABPV era un cofactor en las pérdidas de colonias observadas en primavera (Berenyi et al. 2006). Más recientemente, se ha señalado a KBV como marcador del SDC (Pettis, 2008). Por tanto, la implicación de estos virus en la pérdida de colmenas requiere de más estudios que determinen su papel real y la interacción con otros factores como Varroa.

4.3.4. *Virus de la parálisis crónica (CBPV)*

El virus CBPV se descubrió en 1963 junto con ABPV (Bailey et al. 1963), aunque los síntomas de la enfermedad que produce se conocen desde la Grecia Antigua, siendo la enfermedad vírica más reconocible en la inspección de la colmena.

Distribución y estacionalidad. CBPV se distribuye mundialmente (Allen y Ball, 1996), aunque no se encuentra en grandes prevalencias, registrándose las mayores en Francia, donde se ha encontrado hasta en el 28% de colmenares asintomáticos (Tentcheva et al. 2004). Las mayores prevalencias y cargas de este virus se registran en primavera y verano, mientras que en otoño se aprecia un marcado descenso, aunque la enfermedad se puede apreciar durante todo el año (Faucon et al. 2002).

Transmisión y patogenia. La forma más común de aparición de CBPV es en infecciones encubiertas, con brotes esporádicos de enfermedad evidente que presenta una sintomatología característica distinguible de otros virus. CBPV tiene especial tropismo por las células del sistema nervioso y tegumentario dando lugar a dos tipos de sintomatologías diferentes pero que pueden apreciarse en la misma colmena (Ball y Bailey, 1997). El tropismo por el sistema nervioso provoca el “síndrome de tipo 1”, caracterizado por el temblor de alas y cuerpos y la parálisis de las abejas. El tropismo por el sistema tegumentario produce el “síndrome de tipo 2” o “ladronas negras”, que se caracteriza por la parálisis, pérdida de pelo del abdomen, oscurecimiento de la abeja, que aparece brillante y que es rechazada por el resto de abejas de la colonia, dando la impresión de que es una abeja ajena realizando “pillaje” en la colmena. Este tropismo también es responsable de la transmisión por contacto, que se produce cuando los pelos del cuerpo de las abejas se rompen por el roce, especialmente cuando hay muchos individuos en la colmena, y liberan las partículas víricas. Además, CBPV se excreta por las heces, transmitiéndose por ruta fecal-oral. La transmisión de CBPV es independiente de Varroa.

4.3.5. *Virus de la cría ensacada o cría sacciforme (SBV)*

La enfermedad de la cría ensacada fue la primera enfermedad de abejas que se atribuyó a un virus, a principios del siglo XX, aunque no se describió el virus SBV hasta mucho después (Bailey et al. 1964b).

Distribución y estacionalidad. SBV se encuentra ampliamente distribuido en colonias de *Apis mellifera* en todos los continentes (Allen y Ball, 1996), siendo incluso considerado

como el virus más prevalente en determinadas áreas como Australia. SBV es más prevalente durante la primavera, descendiendo su presencia a lo largo de la estación.

Transmisión y patogenicidad. La forma de aparición más frecuente de SBV es en infecciones asintomáticas. Sin embargo, puede dar lugar a infecciones aparentes que se caracterizan por el fallo para realizar la metamorfosis de la cría, ya que la replicación de SBV produce la acumulación de líquido entre la larva y su piel produciendo un “saco”. Las larvas pasan del color nacarado habitual a amarillento, para después pasar a marrón en su extremo marrón y morir en pocos días. Aunque la sintomatología de la enfermedad se aprecia en la cría, SBV se multiplica en adultos sin producir ningún síntoma. Aunque ha generado controversia, su transmisión a través de Varroa parece cada vez más clara, ya que se ha descrito la presencia de SBV tanto en el ácaro como en su saliva (Shen et al. 2005b). SBV también se transmite por ruta fecal-oral y transovárica (Shen et al. 2005b).

4.3.6. Virus de la realera negra (BQCV)

El virus BQCV se aisló por primera vez de pupas de abeja reina parcialmente descompuestas muestreadas de realeras que aparecían oscurecidas, lo cual le otorgó el nombre (Bailey y Woods, 1977).

Distribución y estacionalidad. BQCV es un virus altamente distribuido, presentando prevalencias cercanas al 100% en la época estival, que es cuando alcanza el pico máximo, tras lo cual desciende su presencia en las colonias a partir de agosto. Este ciclo es el mismo que sigue *Nosema apis*, microsporidio al que BQCV se encuentra estrechamente ligado.

Transmisión y patogenicidad. Aunque se detecta en abejas adultas, BQCV no se replica ni produce síntomas en ellas, sino que replica sólo en la cría de abejas y sólo presenta síntomas la pupa de la abeja reina. Se transmite de forma vertical por ruta transovárica y de forma horizontal por ruta fecal-oral, para lo cual requiere de la presencia de esporas de *Nosema apis*. Entre estos dos patógenos además se produce interacción ya que se ha observado que junto con *Nosema apis* acorta la vida de las abejas adultas en mayor grado que *Nosema apis* en solitario (Bailey et al. 1983). La relación de BQCV con Varroa no está clara, ya que se ha apreciado una relación entre ellos (Davison et al. 2004) pero no se ha demostrado experimentalmente.

4.3.7. *Virus de las alas deformadas (DWV)*

El virus DWV fue descubierto en 1982 en abejas adultas en Japón procedentes de colonias infestadas por *Varroa destructor*. Aunque inicialmente se relacionó con el virus egipcio (EV), llamándose “variante japonesa del EV”, pronto se vio que eran serológicamente distintos y se renombró como DWV al relacionarse con los síntomas de alas deformadas encontradas en las colonias (Ribiere et al. 2008; de Miranda y Genersch, 2010). Aunque infecta a *Apis mellifera*, hoy en día existe controversia sobre si es el hospedador original o, al igual que Varroa, DWV proviene de la abeja asiática, en la que también se ha detectado. Además, DWV se ha detectado en especies de abejorros silvestres y domésticos con alas deformadas (Genersch et al. 2006), además de en *Apis florea* y en los parásitos *Tropilaelaps mercedesae* (Dainat et al. 2009) y *Aethina tumida* (Eyer et al. 2009).

Distribución y estacionalidad. La estrecha relación de DWV con *Varroa destructor* ha llevado a que este virus tenga igualmente una distribución mundial, dispersándose con el ácaro principalmente en los años 70 y 80 (de Miranda y Genersch, 2010). Igualmente, la estacionalidad de DWV es similar a la del ácaro, aumentando su prevalencia y carga en las colmenas durante la estación, con pico en otoño.

Transmisión y patogenicidad. En general se considera que DWV es un patógeno que en ausencia del ácaro persiste en las colmenas en infecciones encubiertas asintomáticas, que se transmiten verticalmente tanto por ruta transovárica como a través del semen, y horizontalmente a través de la ruta fecal-oral. Sin embargo, dado que Varroa no sólo transmite DWV sino que lo replica, dando lugar a una amplificación de millones de copias en su interior, en presencia del ácaro DWV puede lugar a una infección aparente, que se conoce como **síndrome del ácaro parásito**. La sintomatología típica de DWV es la presencia de abejas recién nacidas deformadas o con escaso desarrollo de las alas y acortamiento del cuerpo de las abejas (Figura 18). Estos síntomas fueron inicialmente atribuidos a Varroa, aunque la presencia de abejas deformadas en colonias donde Varroa está prácticamente ausente, y viceversa, descartaron a Varroa como único causante de los síntomas (Ball. 1993; Ribiere et al. 2008). Además también se ha descrito el acortamiento de la vida de las abejas un 50-75% (Martin. 2001), cambios en la capacidad de aprendizaje (Iqbal y Mueller, 2007) y aumento de la agresividad (Fujiyuki et al. 2004).

La relación de DWV con Varroa, una de las mayores amenazas de las colonias de *Apis mellifera* ha llevado a estudiar este binomio en profundidad como potencial causa de las pérdidas de colonias. Algunos estudios han señalado que el acortamiento de la vida de las

abejas que produce DWV en presencia de Varroa afecta a la dinámica de la colmena según avanza la estación, y podría explicar su colapso (Martin. 2001). Además, aunque tradicionalmente se ha considerado a DWV como un virus de baja virulencia (Tentcheva et al. 2004), el estudio de muestras de Hawái reveló que, en ausencia de Varroa, DWV está presente en las colmenas en una alta diversidad de variantes, y con la entrada de del ácaro esta diversidad se ve reducida en favor de la selección de la variante de DWV más virulenta (Martin et al. 2012).



Figura 18. Abeja con alas deformadas. Fuente: flickr.com

4.3.8. Otros virus

Virus X y Virus Y (BVX y BVY). Estos dos virus se han encontrado en varios países de Europa, sobre todo en Reino Unido donde fueron descritos por primera vez. Se trata de dos virus que sólo causan infección por vía oral y que no suelen producir sintomatología. Están íntimamente ligados con dos patógenos que se replican en el intestino, *Malpighamoeba mellificae* en el caso de BVX, y *Nosema apis* en el caso de BVY. La combinación BVX-ameba se ha asociado al acortamiento de la vida de las abejas y BVY-microsporidio se han asociado con un potenciamiento del efecto patógeno de Nosema sobre la colmena (Bailey et al. 1983). Sin embargo, no se ha demostrado la relación de ninguno de estos virus con las pérdidas de colmenas a gran escala (Ribiere et al. 2008).

Virus filamentoso (AmFV). Este virus se diferencia de los demás por su tamaño (150x450 nm), su forma de “filamento” similar a los baculovirus y su genoma, que es ADN. Su infección produce la ruptura del cuerpo graso de la abeja, lo que provoca que la

hemolinfa de las abejas infectadas sea más densa o “lechosa”. Aunque en ocasiones se ha encontrado en abejas con parálisis en la entrada de la colmena, este virus no suele producir síntomas. Su transmisión está estrechamente ligada a *Nosema apis*, aunque el efecto patógeno del microsporidio no se ve aumentado en presencia de AmFV (Bailey et al. 1983). Recientemente se ha descartado la relación de AmFV con tripanosomas, aunque se ha descrito la relación de AmFV y los virus ARN, sin que se haya apreciado impacto de este virus en la pérdida de colmenas durante el invierno (Hartmann et al. 2015).

Virus de la parálisis lenta (SBPV). Este virus recibió su nombre de la parálisis que produce en el primer par de patas de las abejas a los 12 días post-inyección. Se trata de un virus poco conocido, que produce infecciones asintomáticas y que se transmite horizontalmente y a través de Varroa.

Virus de las alas opacas (CWV). Se ha descrito que el síntoma que produce este virus es la pérdida de transparencia de las alas de las abejas y la muerte temprana de las abejas, aunque posteriores estudios de histopatología lo han puesto en duda (Bailey et al. 1980). Se conoce poco sobre este virus, aunque se sabe que tiene una amplia distribución y que suele aparecer en infecciones asintomáticas. El papel de Varroa en la transmisión de este virus también es desconocido (Ribiere et al. 2008).

Virus de reciente descubrimiento: Virus de la parálisis lenta de los ápidos (ALPV) y Virus del lago Sinaí (LSV). Las técnicas de secuenciación masiva y la metagenómica, que se abordarán en el siguiente epígrafe, han abierto un nuevo campo de investigación en el colapso de las colmenas, ya que permiten encontrar cualquier virus presente en las muestras. De esta manera se han descrito recientemente algunos virus presentes abejas de los que se desconoce su efecto sobre la salud de las mismas. Éste es el caso de los virus ALPV y LSV. El virus ALPV es un dicistrovirus que se había descrito en especies de ápidos y que ha sido relacionado con el declive de algunas especies consideradas como “plaga” (Van Munster et al. 2002a). En abejas se trata de un virus poco frecuente que tiene mayor presencia en verano (Runckel et al. 2011), cuando las abejas se alimentan de gotas de miel excretadas por estas especies cuando hay poco néctar en el campo. Sin embargo, se desconoce si estos virus realmente producen infección en las abejas o sólo se encuentran en éstas de manera accidental. Los virus LSV-1 y LSV-2 se detectaron por primera vez en EEUU mediante metagenómica (Runckel et al. 2011). Se trata de dos virus con una organización del genoma similar a la de CBPV y muy similares entre sí en cápside y tamaño de genoma, aunque LSV-1 tiene su pico de incidencia en

verano mientras que LSV-2 lo tiene a principios de primavera (de Miranda et al. 2013). Su papel patógeno en *Apis mellifera* es todavía desconocido.

4.3.9. Infecciones víricas múltiples

Multitud de estudios han demostrado que los virus de abeja rara vez se encuentran en infecciones únicas, sino que varios virus pueden infectar al mismo tiempo la misma colonia (Tentcheva et al. 2004; Berenyi et al. 2006; Cox-Foster et al. 2007; Kukielka y Sanchez-Vizcaino, 2009; Bacandritsos et al. 2010; Genersch et al. 2010) e, incluso, el mismo individuo (Chen et al. 2004b; Chen et al. 2006; Yue et al. 2006). Este hecho ha llevado a la comunidad científica a estudiar las interacciones e interferencias que se producen entre virus. Por ejemplo, se ha descrito que ABPV no se replica en pupas inoculadas junto con BQCV o SBV (Bailey et al. 1981), que DWV se multiplica en pupas infestadas con Varroa en detrimento de KBV (Shen et al. 2005a) y que en pupas con infecciones inaparentes de BQCV, KBV y SBV son inyectadas con búfer salino a 35°C sólo se activa la replicación de KBV, mostrando un fenómeno de competencia entre virus (Anderson y Gibbs, 1988).

La presencia de varios virus en el mismo individuo ha llevado a pensar en fenómenos de recombinación, ya que los genomas de ARN de cadena simple son muy lábiles en este sentido y propensos a recombinaciones. De hecho, se considera que los virus del complejo ABPV-IAPV-KBV (de Miranda et al. 2010a) y DWV-VDV1 (de Miranda y Genersch, 2010) puedan tener origen en sucesivas recombinaciones, algunas de las cuales se han señalado como causantes del colapso de colonias, como en el caso de las “quasiespecies” de DWV (Bayer-Wilfert et al. In press).

4.4. Diagnóstico de enfermedades víricas en abejas

Las enfermedades víricas se conocen desde hace siglos, ya que se tienen registros de la observación de síntomas compatibles, aunque no se conocía que su etiología era vírica. Los primeros ensayos que evidenciaron la presencia de virus como causantes de enfermedades se limitaron a infectar abejas sanas a partir de filtrados de macerados de abejas con síntomas, en los que por tanto se eliminaban las bacterias, y a observar el desarrollo de la sintomatología en estas abejas infectadas. Por eso, en un primer momento los virus de abeja se denominaron “elementos filtrables” (Ribiere et al. 2008). Desde este primer contacto, el diagnóstico vírico de abejas ha evolucionado hasta las técnicas que

conocemos hoy en día. Sin embargo, los virus de abejas presentan unas características especiales que limitan su diagnóstico.

4.4.1. Características especiales que influyen sobre su diagnóstico

Partículas isométricas. La mayoría de los virus de abeja son muy similares, ya que tienen forma icosaédrica y tamaño de 30 nm, con excepción del virus AmFV y el virus iridiscente (AIV) que son de mayor tamaño y presentan formas diferentes, y los virus CBPV y CWV que son de menor tamaño (17 nm). Esto hace que el diagnóstico diferencial mediante microscopía electrónica sea insuficiente para identificar el virus causante de una infección.

Ausencia de crecimiento en líneas celulares. A diferencia de otros virus, que crecen en líneas celulares en las que se puede observar un efecto citopático, los virus de abeja no crecen en ninguna línea celular. En un estudio reciente se inocularon células de una línea celular primaria con IAPV, que fue detectado en dos pases celulares. Sin embargo, este estudio no llegó a demostrar una infección real de las células, ya que el virus fue detectado por RT-PCR y no se incluyó la descripción de ningún efecto citopático (Hunter. 2010).

Ausencia de producción de anticuerpos (Ac). Las abejas, como todos los insectos, carecen de una respuesta inmune adaptativa o adquirida en la que existe una producción de Ac que reaccionan con el antígeno y desencadenan diferentes funciones biológicas que tienen como objetivo la destrucción del antígeno. Esta ausencia de Ac determina que los virus de abeja no puedan ser detectados por pruebas serológicas indirectas, y que las pruebas serológicas directas requieren de Ac heterólogos de menor sensibilidad y especificidad.

Infecciones múltiples. Como ya se ha comentado, varios virus de abeja pueden coinfectar un mismo individuo. Este hecho, combinado con la dificultad para diferenciar los virus por otros métodos como la microscopía, y la frecuencia con la que los virus de abeja aparecen de forma asintomática en las colmenas dificulta enormemente su diagnóstico. Las infecciones múltiples limitan en gran medida el diagnóstico mediante ensayos *in vivo*. De hecho, muchos de los virus de abeja fueron descubiertos en experimentos para estudiar otros virus conocidos, como es el caso de ABPV, BVX, CWV, KBV y SBPV (Ribiere et al. 2008).

El diagnóstico de virus de abejas no ha estado exento de dificultades y por tanto, se han ido aplicando diferentes técnicas en su diagnóstico según avanzaba la ciencia. A continuación se hace un breve resumen de algunas de las técnicas más empleadas hasta la llegada de las técnicas moleculares y las técnicas más novedosas, que han supuesto un gran avance en el diagnóstico de virus de abeja.

4.4.2. Diagnóstico “clásico”

El diagnóstico clásico es esencialmente de naturaleza **cualitativa**, ya que los síntomas, partículas víricas o líneas de precipitación están presentes o ausentes. Este tipo de diagnóstico se adapta bien a las técnicas de manejo de enfermedad actuales, que consisten principalmente en actos cualitativos: tratar o no tratar, realizar o no realizar cuarentena, etc. Aunque existen multitud de técnicas, sólo se mencionarán algunas de las más empleadas.

Observación de síntomas. La observación de síntomas continúa siendo una de las principales técnicas de diagnóstico de enfermedades víricas a nivel de campo. Sus ventajas es que es una técnica robusta, simple y barata, e incluso precisa para alguna de las enfermedades víricas. Por esta razón, es la técnica que emplean los apicultores cuando manejan sus colmenas. Los inconvenientes que presenta son que, debido a que los virus de abeja suelen presentarse en infecciones encubiertas asintomáticas, cuando la infección se activa y se observan síntomas, estos suelen ser inespecíficos y pasar desapercibidos, como el acortamiento de la vida de las abejas. Además, no se observan síntomas en todos los estadios (falta de universalidad), y sucede que varios virus pueden producir el mismo síntoma, como la parálisis, o que un mismo virus produce síntomas diferentes, por ejemplo CBPV. Por último, la colonia puede presentar más de una enfermedad al mismo tiempo, lo cual lleva a confundir los síntomas. Por tanto, se trata de un diagnóstico que no es lo suficientemente sensible y específico para permitir establecer medidas preventivas o tratamientos eficaces en la colonia afectada y que impidan la transmisión de la enfermedad de entre colmenas del mismo colmenar (de Miranda. 2008).

Microscopía electrónica. Es una herramienta útil para caracterizar virus en función de su morfología y distribución en tejidos, aunque se utiliza sobre todo en la caracterización de nuevos virus y no como una técnica de diagnóstico de rutina. Sin embargo, presenta el inconveniente de que no puede diferenciar por sí misma los diferentes virus de abeja debido a su forma y tamaño similar (Figura 19). Para aumentar su especificidad requiere de la combinación con otras técnicas histológicas, serológicas y moleculares (Fievet et al. 2006) que hacen el diagnóstico más laborioso y costoso.

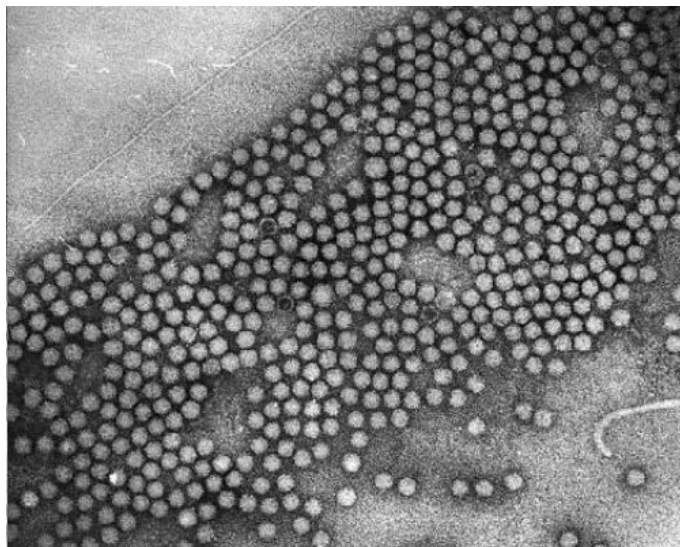


Figura 19. Partículas de ABPV al microscopio electrónico. Fuente: Brenda Ball

Ensayos *in vivo*. También conocidos como tests o pruebas de infectividad, consisten en la inoculación de preparados víricos en larvas o adultos, donde la mayoría de los virus se multiplican rápidamente hasta niveles que son detectados por serología (Dall. 1987) (Figura 20). Como ventajas, estos ensayos son sensibles, ya que incluso niveles bajos de virus inyectados en las abejas son capaces de replicar y ser detectados. Además, puede considerarse un método semicuantitativo, ya que se pueden realizar diluciones seriadas de un mismo inóculo y comparar su detección por la misma técnica en pruebas sucesivas. En cambio, presenta los inconvenientes de que se trata de una técnica laboriosa que requiere del mantenimiento de adultos o larvas en el laboratorio. Además, dada la amplia distribución de los virus hoy en día, es prácticamente imposible encontrar colonias exentas de virus sobre las que realizar el ensayo, de manera que virus inaparentes que se encuentran en niveles muy bajos pueden activar su replicación con la sola inyección de búfer estéril, lo que puede interferir en el diagnóstico (Bailey. 1967). Aun así, mediante este método se han descubierto varios de los primeros virus descritos, y hoy en la actualidad se sigue empleando.



Figura 20. Extracción de hemolinfa en un experimento *in vivo*. Fuente: imagen propia

Proteínas y serología. Estas técnicas se basan en la detección directa de proteínas víricas en muestras de abejas. Existen multitud de métodos que han sido ampliamente empleados en el descubrimiento y caracterización de las enfermedades víricas. Algunos de estos métodos han sido especialmente empleados para la caracterización inicial de virus e incluso variantes de virus, como el perfil proteico y la inmunodifusión en gel de agarosa (AGID). El perfil proteico consiste en la separación de las diferentes proteínas del virus por su tamaño, proporcionando un patrón o perfil que es específico del virus. El método más empleado es la separación por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE y SDS-PAGE), aunque se trata de un método muy laborioso y cualitativo. El AGID se basa en la precipitación de los complejos antígeno-Ac, tratándose de una prueba rápida, robusta y relativamente barata, pero presenta el inconveniente de que sólo ofrece un diagnóstico cualitativo. Otra técnica serológica ampliamente utilizada es el ELISA, que fue la principal técnica diagnóstica de virus de abeja hasta los años 90. Presenta las ventajas de ser una técnica barata, semicuantitativa, automatizable y que permite hacer gran cantidad de muestras a la vez. Sin embargo, es una técnica que no permite hacer diagnóstico “multiplex”, por lo que sólo se puede evaluar un virus cada vez y requiere de normalización y cuantificación con estándares externos (otras muestras) (de Miranda. 2008). Además, todas las técnicas serológicas presentan el inconveniente de la ausencia de producción de Ac en abejas, por lo que requieren de la producción de Ac heterólogos en animales de experimentación, lo cual reduce su sensibilidad, mediante inoculación de preparados víricos

en los que se suele encontrar varios virus. Esto produce Ac policlonales frente a varios virus, lo que pone en riesgo la especificidad de la prueba.

4.4.3. Diagnóstico molecular: PCR

Las técnicas modernas de diagnóstico molecular son esencialmente de naturaleza **cuantitativa**, estableciendo “umbrales” artificiales o calculados por encima de los cuales se considera que el virus está presente y es perjudicial y por debajo de los cuales no, facilitando así la actual forma de manejo de las colonias. Actualmente la técnica más empleada en el diagnóstico de enfermedades víricas por las posibilidades que ofrece es la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR).

Desde la invención de esta técnica en 1986 (Mullis et al. 1987), se han adaptado numerosas RT-PCRs al diagnóstico de multitud de virus de abejas (de Miranda, 2008), convencionales en primer lugar y más tarde en tiempo real (RT-qPCR). Si las RT-PCRs convencionales supusieron un aumento de la sensibilidad considerable en el diagnóstico de virus de abeja, las RT-qPCR resultaron un gran avance, puesto que son aún más sensibles y además permiten la cuantificación de la carga vírica. Esta determinación de la carga vírica puede, por tanto, ser clave a la hora de diferenciar en qué colonias existe realmente un problema atribuible a un determinado virus, ya que la naturaleza encubierta de la mayoría de infecciones víricas y la presencia de síntomas inespecíficos hace que la sola detección de un virus en una colonia sea poco informativa.

Existen dos tipos de cuantificación: relativa y absoluta. En la **cuantificación relativa** se emplea como control una muestra de referencia, de la que se desconoce su carga exacta, para cuantificar las muestras problema. Este control puede ser una muestra previamente caracterizada o por ejemplo el día 0 de una infección experimental. De este modo, se sabe si una muestra presenta más o menos carga vírica en comparación con el control, y se cuantifica la magnitud de esta diferencia. Por el contrario, en la **cuantificación absoluta** se determina la carga vírica de una muestra, a partir de la extrapolación del valor del ciclo umbral o Ct en una curva de calibración (o estándar) realizada con un control previamente caracterizado (Figura 21).

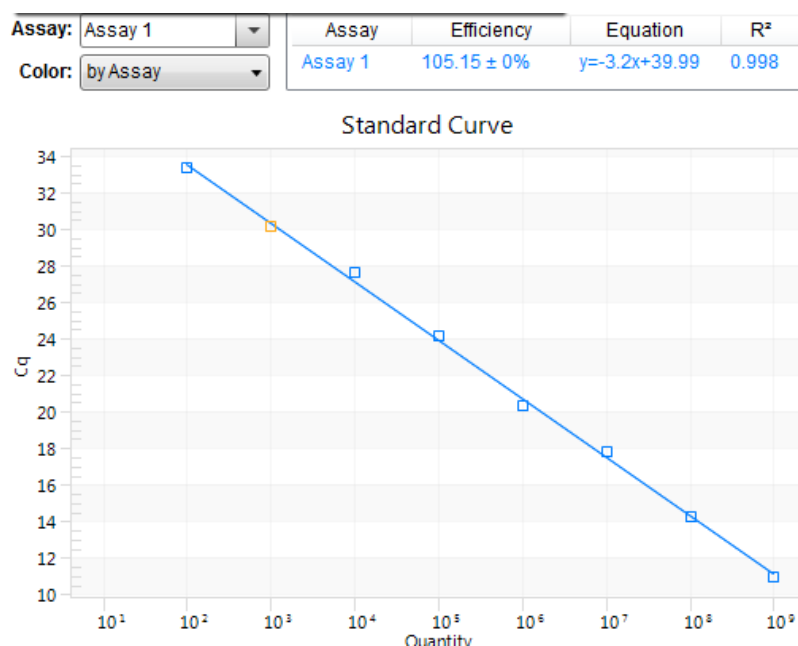


Figura 21. Ejemplo de curva estándar. Fuente: imagen propia

Además de la alta sensibilidad y la posibilidad de cuantificar la carga vírica, la RT-qPCR es rápida, específica, permite hacer diagnóstico “multiplex” (Evans et al. 2013) y cada vez es más asequible, por lo que se ha convertido en la técnica de rutina realizada en la mayoría de laboratorios que estudian las enfermedades víricas de las abejas. Sin embargo, es necesario tener algunas precauciones tanto en el diseño como en la interpretación de estas técnicas, ya que al ser más sensible es más susceptible de la aparición de falsos positivos y la presencia de virus muy similares, como el complejo ABPV-IAPV-KBV y DWV-VDV1, requieren de un diseño de cebadores muy específico. A pesar de estas precauciones, el principal inconveniente de esta técnica es que requiere del conocimiento previo del genoma del virus a diagnosticar, por lo que infecciones por virus que aún no han sido caracterizados pueden ser atribuidos erróneamente a otros virus presentes en la misma muestra. Esta limitación, así como la aparición del SDC y las pérdidas invernales, que no se explican por la presencia de ninguno de los virus conocidos, llevaron al desarrollo e implementación de las técnicas de secuenciación masiva.

4.4.4. Nuevos avances: metagenómica de virus

La metagenómica de virus es el estudio de la composición genética vírica completa de una muestra biológica o ambiental sin el conocimiento previo de la secuencia. Esta técnica tiene el potencial de detectar ácidos nucleicos de virus ARN y ADN de la muestra en muestras de individuos sanos y enfermos (Delwart. 2007; Tang y Chiu, 2010). La técnica

se basa en la amplificación masiva de todas las secuencias de ARN y ADN, siguiendo una sucesión de pasos que se resumen en la Figura 22. A diferencia de la PCR, la metagenómica emplea cebadores degenerados, es decir, que se pueden unir complementariamente a cualquier secuencia, a partir de los cuales se establecen unas “librerías” de fragmentos de ADN que son sometidos a una amplificación y una secuenciación masiva. Existen varios tipos de secuenciación masiva, en función de la plataforma usada: tecnología 454, Illumina y SOLiD, que se diferencian en el principio de secuenciación (Blomström. 2010). La secuenciación masiva es un proceso que genera varios cientos de miles de “lecturas” de la secuencia en cada prueba. Esta gran cantidad de información generada requiere de un análisis de datos informático especializado denominado “bioinformática”, que se ha convertido en sí mismo en un nuevo campo de investigación. Básicamente, las secuencias son ensambladas entre sí formando grupos de secuencias pertenecientes a la misma región del genoma, denominados “contigs”, que son comparados con las secuencias conocidas de las bases de datos para establecer con qué organismos tienen similitud los nuevos genomas secuenciados.

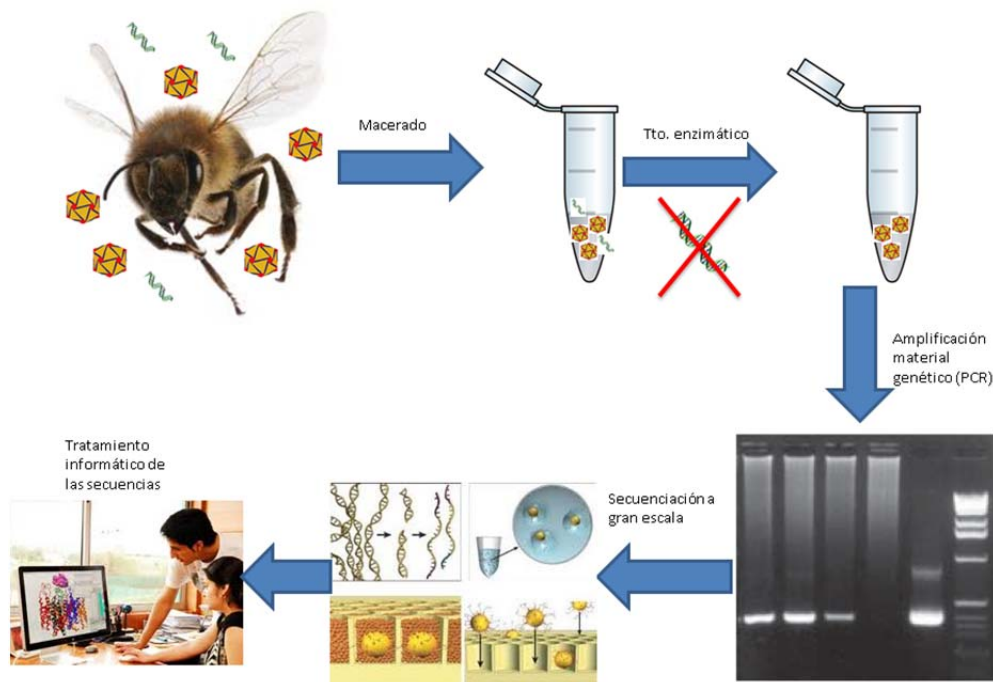


Figura 22. Esquema del procedimiento a seguir en metagenómica. Fuente: elaboración propia.

Ante la imposibilidad de encontrar una explicación satisfactoria a las pérdidas de abejas, y las amplias posibilidades que ofrece la metagenómica, esta tecnología empezó a

usarse en las colonias en busca de patógenos aun no descritos. Uno de los primeros ejemplos fue el trabajo de Cox-Foster et al., (2007), en el que se relacionó estadísticamente la presencia de IAPV con el SDC. Otros trabajos han descrito la flora del intestino de las abejas con el objetivo de determinar los organismos simbioses (Engel et al. 2012; Engel y Moran, 2013). Recientemente la metagenómica se ha empleado en el estudio de los microorganismos presentes en colmenas con alta y baja infestación de Varroa (Nazzi et al. 2012), en colmenas sanas y con SDC (Cornman et al. 2012) y en el estudio de la respuesta inmune de pupas infectadas con DWV (Ryabov et al. 2014).

Las aplicaciones de la metagenómica vírica son tan extensas como sus posibilidades. Así, Blomström aplica esta tecnología para investigar una enfermedad compleja potencialmente causada por varios virus (Blomstrom et al. 2009; Blomström et al. 2010), para investigar una enfermedad de etiología desconocida (Blomstrom et al. 2010) y para investigar la transmisión de una enfermedad mediada por vectores (Blomström. 2011). En el caso de los virus de abejas, la metagenómica ha descubierto virus hasta el momento desconocidos, como los virus LSV-1 y LSV-2 (Runckel et al. 2011) y una nueva variante del LSV (Cornman et al. 2012). Sin embargo, es necesario recordar que la presencia de un ácido nucleico de un virus no implica necesariamente que ese virus sea el causante de la enfermedad. Por ello, se considera que la metagenómica ofrece la posibilidad de descubrir patógenos que aún no se han descrito, pero cuyo efecto patógeno debe ser demostrado mediante ensayos *in vivo*. En este sentido, los estudios de los organismos simbioses de las abejas son también esenciales para descartar microorganismos como causantes de una sintomatología. Otros inconvenientes de esta tecnología son la complejidad del análisis bioinformático y los elevados costes, aunque los nuevos programas informáticos y las nuevas plataformas de secuenciación cada vez ofrecen posibilidades más económicas.

4.5. Epidemiología de enfermedades víricas

La Epidemiología se define tradicionalmente como el estudio de la distribución de enfermedad y de sus determinantes en una población (Woodward. 2013). Tras numerosos estudios, se considera que los virus son uno de los determinantes fundamentales de la pérdida de colmenas. Además la mayoría de estos virus tienen una amplia distribución en las colonias de *Apis mellifera*, y algunos de ellos, una estrecha relación con otro de los patógenos que condiciona la salud de las colonias, el ácaro *Varroa destructor*. Además, las infecciones víricas, a pesar de encontrarse de manera encubierta y persistente en las

colmenas, pueden activar su replicación y causar daño a la colonia en presencia de otros factores, como condiciones medioambientales inadecuadas. Por tanto, conocer la distribución de las enfermedades víricas, los factores de naturaleza biótica (otros patógenos, el estado inmune del hospedador) y abiótica (manejo inadecuado, condiciones medioambientales adversas) relacionados con los virus y su influencia sobre las colonias resulta fundamental para establecer una estrategia de protección de las colonias de *Apis mellifera*.

4.5.1. *Epidemiología descriptiva: recogida de información*

El primer paso para el estudio de las enfermedades víricas es conocer su distribución en una población definida. Los estudios cuyo objetivo es conocer la presencia de virus en una población en un momento concreto son **estudios observacionales y transversales**, un ejemplo son las encuestas de vigilancia. En estos estudios se puede medir la frecuencia de enfermedad con parámetros como la prevalencia. La ventaja de estos estudios es que son baratos, relativamente fáciles y rápidos de realizar y sus resultados son el pilar para futuros estudios en los que el diseño y la selección de la población sean más rigurosos (vanEngelsdorp et al. 2012). Estos estudios pueden realizarse gracias a las nuevas herramientas empleadas en el diagnóstico de virus, que ofrecen la posibilidad de un diagnóstico sensible y específico.

La recogida de información para estudiar las enfermedades víricas consta tanto de la recogida de muestras como la recogida de información epidemiológica relevante (Figura 23). En los muestreos se recoge una muestra de la población que se quiere estudiar. Para el estudio de virus, la muestra recomendada en los protocolos estándar son las abejas adultas, puesto que aunque muchos de los virus no producen síntomas en adultos, sí están presentes en estas abejas. Sin embargo, si existe la posibilidad de muestrear cría se puede obtener información muy valiosa sobre la dinámica del virus en las colonias. Otra de las consideraciones a la hora de decidir cómo hacer un muestreo es cuándo realizarlo. Debido a la estacionalidad que presentan muchos de los virus, realizar un solo muestreo puede ser poco significativo para conocer la dinámica del virus en la población de estudio. Muchos estudios realizan al menos dos muestreos atendiendo a la actividad de la colmena (primavera-verano y otoño-invierno) (Dainat et al. 2012; Mondet et al. 2014), realizan varios muestreos al año o estudian más de un periodo definido (Mondet et al. 2014). Por su parte, la realización de encuestas epidemiológicas ofrece la posibilidad de recabar información asociada a cada colmenar e incluso a cada colmena en cuanto a sintomatología

observada, condiciones de manejo, alimentación, tratamiento acaricida, etc., que es fundamental a la hora de analizar factores relacionados con la presencia de enfermedades en las colonias.



Figura 23. Toma de muestras de colmenas comerciales. Fuente: imágenes propias.

4.5.2. Epidemiología analítica: análisis de la información

Una vez conocida la distribución de la enfermedad en la población de estudio, el siguiente paso es poner a prueba una hipótesis específica acerca de la relación de la enfermedad a una causa o factor de riesgo, mediante la llamada epidemiología analítica.

Actualmente se considera que las pérdidas de colonias que se han venido observando en los últimos años no se deben a una sola causa, sino que se trata de un problema **multifactorial**. Por tanto, son varios los factores de riesgo que se pueden estudiar en relación con la pérdida de colonias, incluidos los virus, Varroa y otros patógenos, prácticas de manejo, condiciones ambientales, etc. Así mismo, son varios los análisis estadísticos que se pueden emplear para comprobar la relación entre los factores de riesgo y la presencia de enfermedad (Pirk et al. 2013).

El análisis debe efectuarse en varias etapas, desde los análisis más simples a la integración de varios factores de riesgo en análisis multivariantes. En primer lugar se pueden establecer relaciones entre los diferentes factores cuantitativos mediante un análisis de correlación (tests de Spearman y de Pearson). Estos análisis pueden ayudar a identificar

interacciones entre factores de riesgo y posibles “variables confusoras”. Además, se pueden distinguir varias asociaciones entre virus y otros factores que luego pueden ser probadas experimentalmente, como por ejemplo, la sinergia entre DWV y Varroa, cuya asociación no sólo es estadística, si no que se ha comprobado *in vivo*. En cambio, otras asociaciones no están tan claras y varían según el estudio, como DWV y *Nosema ceranae*: competitiva (Doublet et al. 2015), sinérgica (Zheng et al. 2015), no relación (Martin et al. 2013). Otros test estadísticos permiten establecer diferencias en la media y la varianza de los distintos factores de riesgo, y se aplican en función de la distribución de los datos (normal vs. no normal) (ANOVA entre grupos vs. Kruskal-Wallis, T-test vs. Mann Whitney U, T-test pareado vs. Wilcoxon, etc.). Por otro lado, se pueden establecer relaciones entre la presencia de la exposición al factor de riesgo y la ocurrencia del evento, por ejemplo mediante un test de Chi cuadrado. Por último, el análisis de regresión permite establecer relaciones causales estadísticas entre la presencia de enfermedad y los diversos factores de riesgo analizados en modelos multivariantes. En definitiva, estos estudios son el punto de partida para establecer potenciales causas o conjunto de causas de la pérdida de colmenas, que han de comprobarse y estudiar con mayor detalle en estudios experimentales controlados.

4.5.3. Epidemiología molecular

La epidemiología molecular surge como importante herramienta empleada para determinar relaciones filogenéticas entre diversas secuencias genéticas mediante el empleo de análisis estadísticos que, a su vez, permiten extraer conclusiones acerca del origen, evolución y variación de dichas secuencias. Si aplicamos esta herramienta al análisis de virus patógenos, podremos determinar la proximidad genética entre aislados procedentes de diferentes orígenes. De este modo, tras el análisis de esta información y su representación gráfica en árboles filogenéticos basados en divergencias/convergencias genéticas, podremos identificar aislados similares o iguales en las distintas muestras analizadas y por tanto, determinar un origen común, una vía de transmisión y la frecuencia relativa en la que encontramos el aislado en cada origen y vía. El **análisis filogenético** permite por tanto la comparación del genoma vírico, o parte del mismo, con secuencias de virus previamente caracterizadas y por tanto proporciona mucha información que puede ayudar a tomar decisiones para prevenir o controlar una enfermedad. El análisis filogenético requiere de la secuenciación de al menos una parte del genoma del virus a estudiar, de una base de datos de secuencias con la que compararlo (por ejemplo, algunas de libre acceso como GenBank) y la representación de las distancias genéticas mediante árboles filogenéticos. Los árboles

filogenéticos se basan en modelos de sustitución de pares de bases y pueden ser de varios tipos en función del algoritmo empleado, por ejemplo los modelos Neighbour-Joining, de máxima verosimilitud y bayesiano, entre otros (Nei y Kumar, 2000; Tamura et al. 2007). En el caso de los virus de abeja, las aplicaciones del análisis filogenético son la clasificación y taxonomía de nuevos virus, el estudio del origen de un virus en una población (por ejemplo, la introducción de un virus en un territorio en el que estaba ausente a través del comercio de enjambres), así como complemento en el estudio de la diversidad y del potencial patógeno de un virus (Martin et al. 2012; Ryabov et al. 2014).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



JUSTIFICACIÓN

Preservar las abejas es una de las mayores preocupaciones de la comunidad científica a nivel mundial, ya que, de lo mencionado anteriormente, se extrae que estos insectos tienen un alto impacto socio-económico y medioambiental. Prueba de ello son las recientes políticas llevadas a cabo en la UE, recogidas en los programas marco FP7 y Horizon 2020, que se han orientado al estudio de las abejas y la protección de la agricultura y la biodiversidad.

En España, país de la UE con mayor censo de colmenas y producción de miel, conocer las causas de la pérdida de colmenas resulta de vital importancia para el sector apícola y todas las actividades que se benefician de la actividad de la abeja. Se considera que no existe una única causa que explique este fenómeno, sino que son varios los factores potencialmente implicados e interrelacionados, incluyendo los contaminantes ambientales y el mal uso de fitosanitarios, el clima, la pérdida de hábitats y fragmentación del territorio, así como la expansión de los agentes patógenos, que sin duda juegan un papel fundamental en estas pérdidas. Dentro de la gran variedad de agentes patógenos que afectan a las abejas, los virus generan un gran interés por su distribución y presencia en las colonias, por su capacidad de provocar infecciones persistentes, por su relación con otros factores de riesgo para la salud de las abejas y por su asociación demostrada con estados patológicos y pérdidas de colonias. Sin embargo, aún son muchos los interrogantes sobre su patogenia, su interacción con otros factores externos e internos a la colmena y su papel como modificadores del equilibrio con el hospedador hacia estados patológicos individuales y en el conjunto de la colonia. A este respecto, los precedentes del estudio de virus en España son todavía escasos y muchos de ellos de naturaleza descriptiva. Por tanto, existía la necesidad de identificar los riesgos que representan los virus para la salud de las colonias y evaluar las potenciales interacciones entre los propios virus y el resto de factores que afectan a la diversidad y abundancia de estos polinizadores, desde una perspectiva holística y en condiciones de campo representativas del marco geográfico español.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es conocer la implicación que tienen los virus de abeja en la pérdida de colonias en España, así como los factores que están relacionados con su mayor presencia en las colonias, como herramientas para prevenir estas pérdidas en el futuro.

Los **objetivos específicos** de esta tesis doctoral son:

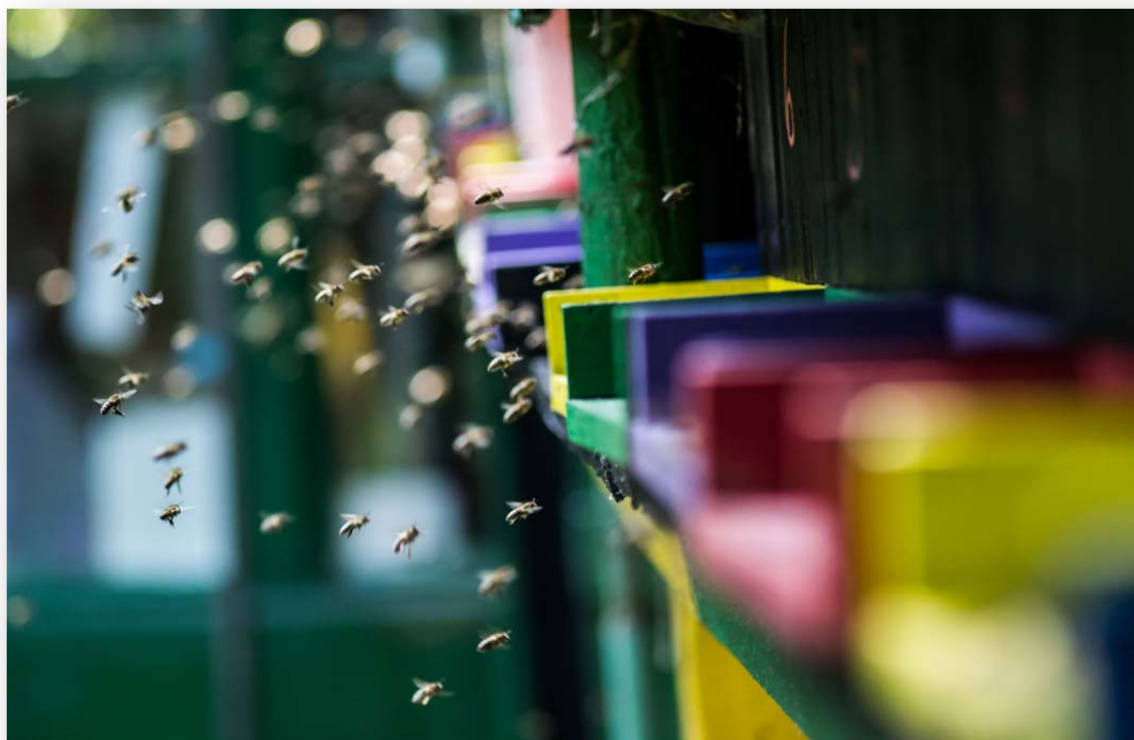
Objetivo 1. Determinar la potencial relación de IAPV con el SDC en colonias de abejas en España.

Objetivo 2. Analizar la presencia de virus desconocidos potencialmente implicados en el SDC mediante metagenómica.

Objetivo 3. Determinar las prácticas de manejo de las colonias que pueden influir en el efecto de las infecciones víricas sobre la salud de las colonias.

Objetivo 4. Analizar la dinámica y las interacciones de los virus junto con otros patógenos y su implicación en el debilitamiento de las colonias.

RESULTADOS



Objetivo 1: Determinar la potencial relación de IAPV con el SDC en colonias de abejas en España



RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 1

El virus IAPV pertenece al denominado complejo ABPV-IAPV-KBV. Estos virus habitualmente producen infecciones encubiertas pero que bajo condiciones que inducen estrés, tales como la presencia de Varroa (vector de estos virus), pueden dar lugar a sintomatología aguda de parálisis y mortalidad con un gran impacto en las colmenas (de Miranda et al., 2010). En el año 2007 se publicó un estudio en EEUU que determinó que IAPV incrementa el riesgo de padecer SDC y señaló a este virus como un indicador significativo de este síndrome en presencia Varroa (Cox-Foster et al., 2007). Este virus ha sido detectado en las colmenas de España (Kukielka y Sánchez-Vizcaíno, 2010), donde la presencia de Varroa es habitual desde los años 80. Además, el virus detectado fue analizado filogenéticamente y se agrupó con otras variantes de IAPV implicadas en el SDC. Sin embargo, a pesar de que posteriores estudios describieron una presencia de IAPV de hasta el 26% en función del año (Garrido-Bailón et al., 2010, Antúnez et al., 2012), no se ha cuantificado este virus y su relación con la pérdida de colmenas no está clara en España. Por tanto, el objetivo 1 de esta tesis doctoral consiste en determinar la potencial implicación de IAPV en el SDC en España. El estudio se centró en Andalucía, puesto que se trata de una importante región apícola, siendo la segunda más importante en producción de miel en España. La presencia y carga de IAPV se estudió en 96 colonias comerciales situadas en todas las provincias de Andalucía en las que se realizó una encuesta epidemiológica y se tomó muestra de abejas adultas. Se determinó mediante RT-PCR que la frecuencia de IAPV en las colmenas muestreadas fue del 13.5% y la carga media 4.9×10^5 copias de genoma equivalente (CGE)/abeja, aunque se detectaron cargas de entre 10^2 y 10^7 CGE/abeja en las colonias muestreadas. Sin embargo, no se encontró asociación entre las colmenas que mostraban debilidad y la presencia de IAPV (χ^2 test, $p > 0.05$). Además, las cargas víricas más altas se observaron tanto en colonias sanas como débiles, indicando que altas cargas de IAPV no producen el colapso de las colmenas por sí solas, aunque sería interesante comprobar a nivel molecular e histopatológico si esta carga de IAPV produce daño a nivel individual. Por otro lado, también se estudió el origen de la variante de IAPV presente en Andalucía mediante un análisis filogenético. El análisis reveló que la variante de IAPV de Andalucía se agrupa junto con muestras de Francia en un clúster diferente del de la muestra de Valencia (Kukielka y Sánchez-Vizcaíno, 2010), que a su vez se agrupa con muestras alejadas geográficamente, indicando la presencia de dos linajes de IAPV evolutivamente distintos, y con diferente origen, en España.

➤ **Artículos científicos:**

Vicente-Rubiano M., Kukielka D., de las Heras A. I., Sánchez-Vizcaíno J.M. (2013). Short Communication. Presence, first quantification and phylogeny of Israeli acute paralysis virus of honeybees in Andalucía (Spain). Spanish Journal of Agricultural Research 11(3):708-711.

➤ **Ponencias y congresos:**

Vicente-Rubiano, M., et al. Presence of different-origin Israeli acute paralysis virus not related with Colony collapse disorder in Spanish honey bees. XIII International Symposium on Veterinary, ISVEE. 2012. Póster.

Vicente-Rubiano, M., et al. Israeli acute paralysis virus of honey bees: origin and first determination of viral load and its clinical importance in Spanish colonies. IX International congress of veterinary virology and joint meeting with the European Society for Clinical Virology (ESVV). 2012. Comunicación oral.

Vicente-Rubiano, M., et al. Estudio de la presencia y análisis filogenético del virus de la parálisis aguda israelí (IAPV) de las abejas en Andalucía. VII Jornadas Complutenses, VI Congreso nacional de investigación para alumnos de pregrado en ciencias de la salud y XI Congreso de ciencias veterinarias y biomédicas, UCM. 2012. Comunicación oral.

Vicente-Rubiano, M., et al. Detección del virus de la parálisis aguda israelí de la abeja (*Apis mellifera*) en Navarra mediante real time RT-PCR. V Jornadas Complutenses, IV Congreso Nacional de investigación para alumnos de pregrado en ciencias de la salud y IX Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas, UCM. 2010. Comunicación oral.

Short communication. Presence, quantification and phylogeny of Israeli acute paralysis virus of honeybees in Andalusia (Spain)

M. Vicente-Rubiano*, D. Kukiela, A. I. de las Heras and J. M. Sanchez-Vizcaino

VISAVET Center and Animal Health Department. Veterinary Faculty. Complutense University of Madrid.
Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid, Spain

Abstract

This study aimed to assess the possible relationship between the presence of Israeli acute paralysis virus (IAPV) of honeybees and disease symptoms development at the colony level, to describe the IAPV load in field colonies and to illustrate phylogenetic relationships between IAPV isolates in Andalusia (Spain). Presence and load of IAPV was studied in 96 colonies from all provinces in Andalusia. Epidemiological surveys were performed in all the colonies to assess their sanitary status. IAPV was found in 13.5% of the sampled colonies, and no association was observed between the presence of IAPV and disease symptoms at the colony level. An average IAPV load was established in $4.9 \cdot 10^5$ genome equivalent copies per bee. Phylogenetic analysis revealed that Andalusian isolates belong to a different lineage to a previously described isolate found in Valencia (2010). The results of this study will help us understand the epidemiology and effect of IAPV on Spanish colonies.

Additional key words: *Apis mellifera*; viral load; phylogenetic analysis; epidemiological survey.

Israeli acute paralysis virus (IAPV) of honeybees is a Dicistrovirus that was first described in 2004 in Israeli colonies that had suffered from heavy losses (Maori *et al.*, 2007). This virus gained prominence after a report in 2007 associated it with the colony collapse disorder (CCD) in the USA, where IAPV presence was considered a statistically significant marker of CCD (Cox-Foster *et al.*, 2007). IAPV has since been described in numerous countries such as China (Xun *et al.*, 2009), Canada and Australia (Palacios *et al.*, 2008), or Argentina (Reynaldi *et al.*, 2011). In Europe, IAPV has been found in France (Blanchard *et al.*, 2008) and more recently in Spain (Kukiela & Sánchez-Vizcaino, 2010) and Poland (Pohorecka *et al.*, 2011). However, the high frequencies found in some countries (up to 41% in Argentina) and lack of obvious disease symptoms in most sampled colonies suggest that IAPV is a widespread virus that usually appears in covert infections, like most Dicistroviruses (De Miranda *et al.*, 2010). Criteria identification to differentiate covert

from overt infections in honeybee colonies is essential to identify risk factors of honeybee diseases, including CCD, where viruses may play an important role. Viral load may influence the development of disease symptoms, thus studies that differentiate the virus load causing covert and overt infections at the colony level are required. Some studies have quantified IAPV loads in experimental infections (Maori *et al.*, 2007, 2009) and have observed high mortality upon inoculation and feeding with purified viral particles. However, none of these studies has assessed IAPV loads in field colonies (commercial hives) until recently (Martin *et al.*, 2012). Another explanation for the covert infection of IAPV is the virulence of the isolate. Most published isolates are low-virulent, as IAPV normally persists in the colony in covert infections, showing no obvious symptoms at the individual or colony level (De Miranda *et al.*, 2010). In Spain, only one sequence has been phylogenetically analysed from one healthy colony in Valencia (Kukiela & Sánchez-Vizcaino, 2010) despite

* Corresponding author: marina@sanidadanimal.info

Received: 17-09-12. Accepted: 08-07-13.

Abbreviations used: ABPV (Acute bee paralysis virus); CCD (colony collapse disorder); CERA (the Beekeeping Reference Centre of Andalusia); COAG (Coordination of Agricultural and Livestock Organisations); GEC (genome equivalent copies); IAPV (Israeli acute paralysis virus); IGR (intergenic region); KBV (Kashmir bee virus); ORF (open reading frame); PBS (phosphate-buffered saline); RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction); RT-qPCR (real-time reverse transcription polymerase chain reaction).

a report of 18% IAPV frequency in 2006 (Garrido-Bailón *et al.*, 2010) and 13% and 25.7% in 2006 and 2007, respectively (Antúñez *et al.*, 2012). This Valencian IAPV isolate was surprisingly clustered with isolates from collapsed colonies from geographically far countries. Thus, new phylogenetic analyses of IAPV are required in Spain to confirm its phylogeny in relation to virulence as compared with other isolates from different countries.

This study aimed to: assess the possible relationship between IAPV presence of honeybees and disease symptoms at the colony level; describe IAPV load in commercial hives; and illustrate the phylogenetic relationships between IAPV isolates by focusing on Andalusia, an important Spanish beekeeping region.

This work studied Andalusia (south-east Spain), which ranks first in hive censuses and is the second most important Spanish honey-producing region. Technicians from the Coordination of Agricultural and Livestock Organisations (COAG) and the Beekeeping Reference Centre of Andalusia (CERA, University of Córdoba) sampled 96 honeybee colonies from all provinces of Andalusia in winter 2010/2011. The study was designed to describe frequencies of honey bee viruses in this autonomous community. Assuming the worse prevalence scenario (50%), sample size was calculated by considering hive censuses with an expected error of 10% and a 95% of confidence interval with WinEpiscope v2.0 (De Blas *et al.*, 2000). One hundred different aged adult bees (nurse bees, guard bees, foragers) were collected per colony and frozen immediately afterwards. Epidemiological data were also collected during sampling by surveys to assess sanitary conditions. No clear CCD symptoms, collapse nor severe winter losses were found in the sampled colonies. Thus the present study focused on the potential association of IAPV with colony weakening represented by colonies with worse health status. Worse health status indicators included presence of clear IAPV disease symptoms, such as paralysis, loss of hair or inability to fly, depopulation, kleptoparasitism of stronger neighbouring colonies, diagnosed disease potentially associated with immune depletion such as chalkbrood (Glinski & Buczek, 2003; Aronstein & Murray, 2010); and problems to control *Varroa destructor* – mite infestation might lead to immunosuppression (Yang & Cox-Foster, 2005), which may facilitate IAPV replication, as *Varroa destructor* has been described as an IAPV vector (Di Prisco *et al.*, 2011). Sanitary status data were collected from the epidemiological surveys con-

ducted by technicians upon sampling. Colonies were classified as “healthy” or “weak” depending on the above-described symptoms appearing or not. Each analytical sample consisted of 50 bees, which were homogenized with 6 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS) using a mortar and pestle. RNA extraction was carried out using the column-based Nucleospin II Virus® kit (Macherey Nagel) following the manufacturer’s instructions.

Samples were analysed for IAPV presence by amplifying virus-specific nucleic acid. One-step real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) was carried out using SYBR-Green dye. Primers targeting a 220-bp region of the gene ORF-2 were used (Palacios *et al.*, 2008), and amplification was done following the thermocycler protocol described by Palacios *et al.* (2008).

Absolute quantification of IAPV-positive samples was performed to determine their viral load. The ORF-2 fragment of IAPV was cloned into a PGemT® TA cloning vector (Promega) following the manufacturer’s instructions. The standard curve was constructed with triplicates of serial dilutions of known amounts of plasmid DNA. The viral load results were expressed in genome equivalent copies (GEC) per bee (Gauthier *et al.*, 2007). One sample from Valencia, previously analysed for IAPV presence in 2010 (Kukielka & Sánchez-Vizcaíno, 2010), was included in the samples quantification with identical procedures because its viral load was not quantified in the previous study. This sample was also included in the phylogenetic analysis as it was the first IAPV isolate found in Spain.

After confirming IAPV presence, RNA samples were first re-amplified by conventional RT-PCR targeting of a 705-bp sequence, which contains the 3’ end of ORF1 (including part of the RdRp polymerase), the intergenic region (IGR) (183-bp) and the 5’ end of the ORF2 region -including part of viral protein 2 (VP2)- of the IAPV genome (Palacios *et al.*, 2008), and were then sequenced. This fragment contains a variable region considered adequate to perform the IAPV phylogenetic analyses, as the highly conserved nature of the RdRp region used in other bee virus phylogenetic analyses can produce cross-reactivity between close KBV and IAPV viruses (Palacios *et al.*, 2008). The resulting 705-bp sequences were utilised to construct a phylogeny of the identified isolates. Complete sequences of the amplified region were aligned with other IAPV sequences from different countries using MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) (Table 1). A phylogenetic

Table 1. Israeli acute paralysis virus (IAPV) sequences used to calculate the phylogenetic tree, shown in order of publication. Acute bee paralysis virus (ABPV) and Kashmir bee virus (KBV) sequences were included as the out-group

GenBank accession No.	Country	Virus	Reference
AF150629	UK	ABPV	Govan <i>et al.</i> , 2000
AY275710	USA	KBV	de Miranda <i>et al.</i> , 2004
EU122347	Australia	IAPV	Cox-Foster <i>et al.</i> , 2007
EU122348	Australia	IAPV	Cox-Foster <i>et al.</i> , 2007
EU122349	Australia	IAPV	Cox-Foster <i>et al.</i> , 2007
EU122350	USA	IAPV	Cox-Foster <i>et al.</i> , 2007
EU122356	USA	IAPV	Cox-Foster <i>et al.</i> , 2007
EU122357	USA	IAPV	Cox-Foster <i>et al.</i> , 2007
EU122358	USA	IAPV	Cox-Foster <i>et al.</i> , 2007
EU122361	USA	IAPV	Cox-Foster <i>et al.</i> , 2007
EU122362	USA	IAPV	Cox-Foster <i>et al.</i> , 2007
EU436427	Canada	IAPV	Palacios <i>et al.</i> , 2008
EU436432	USA	IAPV	Palacios <i>et al.</i> , 2008
EU436443	USA	IAPV	Palacios <i>et al.</i> , 2008
EU436446	Australia	IAPV	Palacios <i>et al.</i> , 2008
EU436447	Australia	IAPV	Palacios <i>et al.</i> , 2008
EU436448	Australia	IAPV	Palacios <i>et al.</i> , 2008
EU436455	Israel	IAPV	Palacios <i>et al.</i> , 2008
EU436456	Australia	IAPV	Palacios <i>et al.</i> , 2008
EU604006	France	IAPV	Blanchard <i>et al.</i> , 2008
EU604007	France	IAPV	Blanchard <i>et al.</i> , 2008
EU604008	France	IAPV	Blanchard <i>et al.</i> , 2008
EU604009	France	IAPV	Blanchard <i>et al.</i> , 2008
EU604010	France	IAPV	Blanchard <i>et al.</i> , 2008
FJ754324	China	IAPV	Xun <i>et al.</i> , 2009
EU218534	USA	IAPV	Chen Y., published in Genbank, 2009
FJ821506	Spain	IAPV	Kukielka & Sánchez-Vizcaino, 2010
JQ435732-JQ435744	Spain	IAPV	Present study

tree was created by using the neighbour-joining test (Fig. 1).

The viral diagnosis results showed that IAPV was present in 13 of the 96 samples (13.5%) with $4.9 \cdot 10^5$ GEC/bee on average (minimum-maximum GEC/bee: $8.6 \cdot 10^3 - 1.2 \cdot 10^7$). The IAPV load of the Valencian sample was $1.43 \cdot 10^5$ GEC/bee. The Andalusian IAPV frequency results were similar to those previously obtained (Garrido-Bailón *et al.*, 2010) with IAPV present in 18 out of 100 samples from 33 Spanish provinces; and more recently, to those of a retrospective study (Antúnez *et al.*, 2012) describing IAPV frequencies of 13% and 25.7% in 2006 and 2007, respectively. Other than IAPV frequency in Andalusia, viral quantification showed that IAPV was present in substantial loads (up to 10^7 GEC/bee). Another study on adult honeybees at the colony level found viral loads of six different honeybee viruses in the order of 10^8 and 10^9 GEC/bee (Gauthier *et al.*, 2007). More recently, Martin *et al.* (2012) reported similar results on the Hawaiian islands

with IAPV loads in the order of 10^7 GEC/bee in covert infections not associated with colony collapse, but with lower prevalences (only 3 colonies of 293 were infected with IAPV). Based on the recent description of the *V. destructor* mite as a transmitter of IAPV (Di Prisco *et al.*, 2011), future studies should also determine IAPV loads in pupae and *V. destructor* to better understand the biology of the virus. In this study, only the effect of IAPV presence and load was considered on weakening colonies in Andalusia. Future weakening colonies research should also contemplate other pathogens, the effect of co-infections and the host-pathogen-environment interaction. Given the IAPV frequency and load in Andalusia, these results suggest that IAPV presence is not an anecdotic finding in Andalusia.

According to the epidemiological surveys, 32 colonies were classified as “weak” and showed one or more above-described disease symptoms. No colony reported CCD or collapse. Eight of these weak colonies were positive to IAPV (25%), but IAPV presence was not

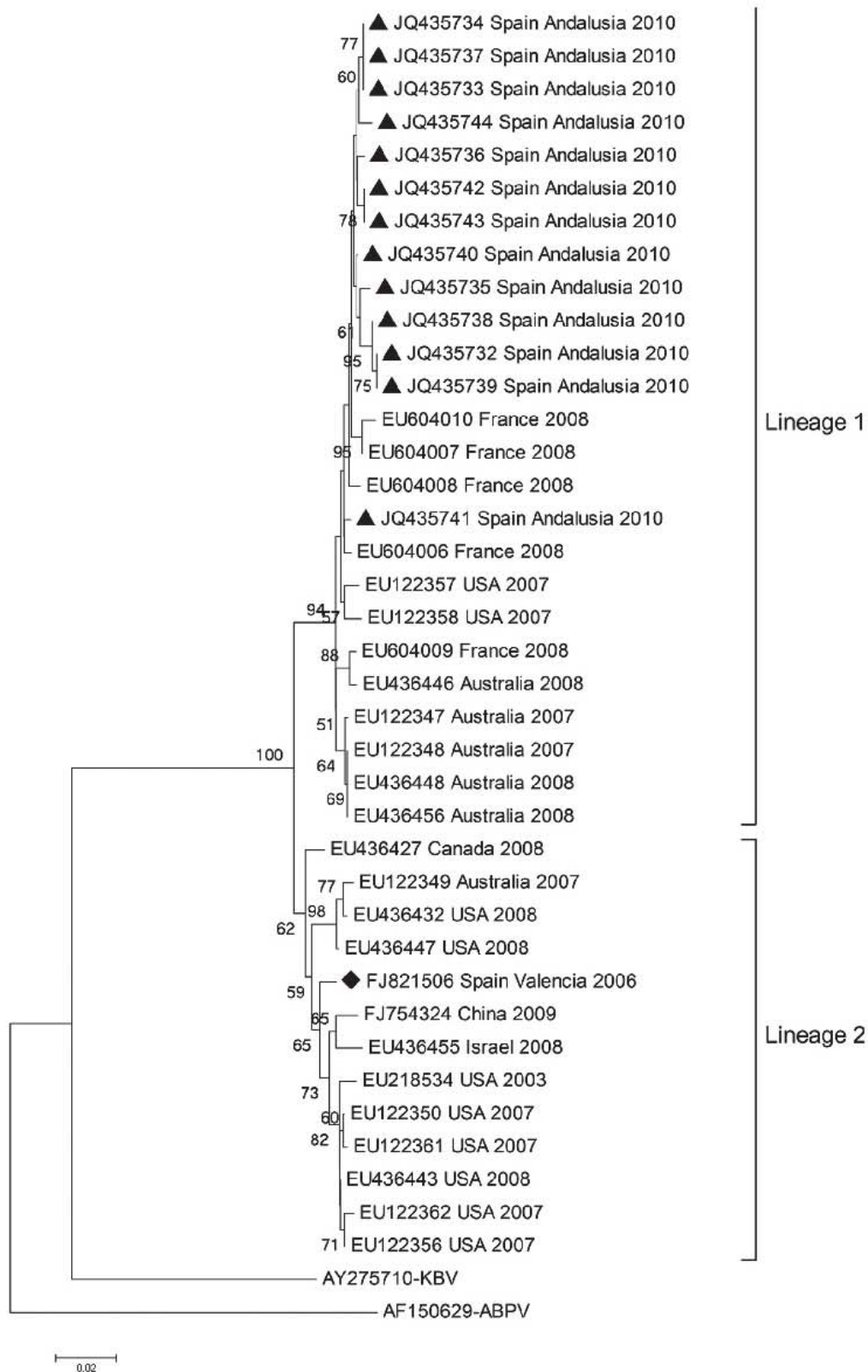


Figure 1. “Neighbour-joining” phylogenetic tree of IAPV sequences. Triangles indicate sequences from Andalusia and the diamond indicates the sequence from Valencia. Acute bee paralysis virus (ABPV) and Kashmir bee virus (KBV) sequences were included as the out-group. Genbank accession numbers, sampling location and year are shown per sequence. The number of each node represents the bootstrap values as the result of 1,000 replicates. Bootstraps values of < 50% were omitted.

associated with weakening (χ^2 test, $p > 0.05$). No specific symptom contemplated in the epidemiological surveys was statistically associated with IAPV presence. Besides, the highest viral loads were present in both healthy and weak colonies, indicating that IAPV loads in the order of 10^7 GEC/bee do not produce obvious disease symptoms at the colony level themselves. However, it would be interesting to perform molecular and histopathological analyses of individual bees to describe the proportion of infected bees per colony as pools of bees were used, thus we cannot ensure that these viral loads do not produce clinical symptoms in individual bees. Future studies should consider this issue to establish the IAPV load baseline in healthy commercial hives.

The phylogenetic analysis revealed two main lineages of IAPV (Fig. 1). The first one grouped all the IAPV sequences from Andalusia in the present study with IAPV isolates mostly from colonies suffering severe winter losses in France. The Valencian isolate (Kukielka & Sánchez-Vizcaíno, 2010) was, however, grouped with the second lineage, which included isolates from collapsed colonies in USA, China, Australia, Israel and Canada. These results confirm the great genetic diversity of IAPV sequences identified in Spain and suggest at least two differentiated evolutionary IAPV lineages in Spain. Andalusian samples may relate more closely to French samples given geographical proximity since natural bee migration between Spain and France can occur in lower-altitude areas of the Pyrenees, near the Atlantic and Mediterranean coasts. Hence, colonies separated by approximately 1,000 kilometres, like those in Andalusia and the northern Spain, can come into contact when beehives are moved to pollinate crops during transhumance, a common practice in Spain where 30.2% (7,323 of 24,251) of colonies are transhumant (MAGRAMA, 2012). The Valencian isolate is phylogenetically divergent from the IAPV isolates described in Andalusia and relates instead to isolates from geographically remote regions. Trade is the most likely explanation for the spread of IAPV between countries; imports of IAPV-positive honeybees from Australia to the USA have been reported (Palacios *et al.*, 2008). The fact that IAPV isolates from healthy and symptomatic hives cluster together suggests that the symptoms development may be linked with viral replication activation and presence of high viral loads. This fact has been suggested (Ribière *et al.*, 2008), but is still to be verified in IAPV. Since IAPV has been found in many Spanish regions, further

phylogenetic analyses are recommended in future studies on IAPV in honeybees. To confirm the results described herein, these future analyses should include the whole genome of the studied IAPV isolates.

Here the results suggest that IAPV is no sporadic finding in Andalusia because its frequency is 13.5% and IAPV presence does not significantly associate with disease symptoms presence at the colony level in this region. Therefore, we report IAPV loads in the order of up to 10^7 GEC/bee in healthy commercial hives, which indicates that presence of these viral loads is not indicative of overt infection at the colony level. Therefore, the development of obvious disease symptoms at this level must be produced by higher viral loads, probably in conjunction with other factors and especially in immunosuppressed colonies. Moreover, Andalusian IAPV isolates are phylogenetically distant from the Valencian isolate, suggesting that IAPV has at least two different evolutionary lineages in Spain. Spanish isolates from healthy colonies relate to isolates from colonies suffering depopulation or collapse in other countries, thus further investigation into isolates virulence in field samples is required. Indeed, phylogenetic analysis may help investigate relevant honeybee virus epidemiology aspects, such as their spread via trade routes, which must be considered when implementing control measures.

In conclusion, this study reports the IAPV frequency in an important Spanish beekeeping region, Andalusia, and lack of association between IAPV presence and disease symptoms at the colony level. It is also the first quantification of IAPV load in Spain and it has established phylogenetic similarities between Andalusian IAPV isolates and those mainly from France by identifying at least two different evolutionary IAPV lineages in Spain.

Acknowledgements

This study has been carried out with the support of the Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment (MAGRAMA) and the Community of Madrid. The authors are grateful to: Dr. Francisco Puerta and José Manuel Fernández of the University of Córdoba (CERA) and to technicians and beekeepers at COAG for collecting samples; the Spanish Ministry of Education for supporting MVR with a FPU grant; Belén Rivera and Rocío Sánchez for their excellent technical assistance.

References

- Antúnez K, Anido M, Garrido-Bailón E, Botías C, Zunino P, Martínez-Salvador A, Martín-Hernández R, Higes M, 2012. Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Res Vet Sci* 93(3): 1441-1445.
- Aronstein KA, Murray KD, 2010. Chalkbrood disease in honey bees. *J Invertebr Pathol* 103(Suppl 1): S20-29.
- Blanchard P, Schurr F, Celle O, Cougoule N, Drajnudel P, Thierry R, Faucon JP, Ribière M, 2008. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* 99: 348-350.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM *et al.*, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318: 283-287.
- De Blas N, Ortega C, Frankena K, Noordhuizen J, Thrusfield M, 2000. WinEpiscope version 2.0. University of Edinburgh.
- De Miranda JR, Drebot M, Tyler S, Shen M, Cameron CE, Stoltz DB, Camazine SM, 2004. Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *J Gen Virol* 85: 2263-2270.
- De Miranda JR, Cordoni G, Budge G, 2010. The acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol* 103(Suppl 1): S30-S47.
- Di Prisco G, Pennacchio F, Caprio E, Boncristiani HF, Evans JD, Chen Y, 2011. *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Gen Virol* 92: 151-155.
- Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Bernal J, Bernal JL, Martínez-Salvador A, Barrios L, Meana A, Higes M, 2010. Short communication. The detection of Israeli Acute Paralysis virus (IAPV), fipronil and imidacloprid in professional apiaries are not related with massive honey bee colony loss in Spain. *Span J Agric Res* 8: 658-661.
- Gauthier L, Tentcheva D, Tournaire M, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2007. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie* 38: 426-435.
- Glinski Z, Buczek K, 2003. Response of the *Apoidea* to fungal infections. *Apiacta* 38: 183-189.
- Govan VA, Leat N, Allsopp M, Davison S, 2000. Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses. *Virology* 277: 457-463.
- Kukielka D, Sánchez-Vizcaino JM, 2010. Short communication. First detection of Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV) in Spanish honeybees. *Span J Agric Res* 8: 308-311.
- MAGRAMA, 2012. El sector de la miel en cifras. Principales indicadores económicos de 2011. Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment. Available in <http://www.magrama.es/>. [March 2012].
- Maori E, Lavi S, Mozes-Koch R, Gantman Y, Peretz Y, Edelbaum O, Tanne E, Sela I, 2007. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J Gen Virol* 88: 3428-3438.
- Maori E, Paldi N, Shafir S, Kalev H, Tsur E, Glick E, Sela I, 2009. IAPV, a bee-affecting virus associated with colony collapse disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Mol Biol* 18(1): 55-60.
- Martin SJ, Highfield AC, Brettel L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, Nikaido S, Schroeder DC, 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* 336(6086): 1304-1306.
- Palacios G, Hui J, Quan PL, Kalkstein A, Honkavuori KS, Bussetti AV, Conlan S, Evans J, Chen YP, vanEngelsdorp D, *et al.*, 2008. Genetic analysis of Israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States. *J Virol* 82: 6209-6217.
- Pohorecka K, Zdanska D, Bober A, Skubida M, 2011. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in Poland and phylogenetic analysis of the isolates. *J Apicult Sci* 55(2): 149-159.
- Reynaldi FJ, Sguazza GH, Tizzano MA, Fuentealba N, Galosi CM, Pecoraro MR, 2011. First report of Israeli acute paralysis virus in asymptomatic hives of Argentina. *Rev Argent Microbiol* 43: 84-86.
- Ribière M, Ball B, Aubert MFA, 2008. Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. In: *Virology and the honey bee* (Aubert M, Ball B, Fries I, Moritz R, Milani N, Bernardinelli I, eds). European Commission, Brussels. pp: 15-84.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Xun Y, XueJiao L, JingHua C, Yi Z, RiChou H, 2009. First detection of Israel acute paralysis virus (IAPV) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in China. *Sociobiology* 54: 95-100.
- Yang Y, Cox-Foster DL, 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc Natl Acad Sci* 102(21): 7470-7475.

Objetivo 2: Analizar la presencia de virus desconocidos potencialmente implicados en el SDC mediante metagenómica



RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 2

La alarmante situación de la pérdida de colonias acaecida a partir de 2004 supuso que numerosos grupos de investigación buscaran su causa contemplando numerosos factores y entre ellos, diversos patógenos. Rápidamente los virus se perfilaron como una de las posibles causas junto con la presencia de Varroa. Sin embargo, ninguno de los virus conocidos pudo explicar por sí solo el colapso de las colonias. Surgió entonces la necesidad de estudiar la posibilidad de que virus desconocidos hasta el momento pudieran estar emergiendo y ser los causantes de estas pérdidas. Sin embargo, las características de los virus de abeja, como la ausencia de producción de anticuerpos, la imposibilidad de emplear cultivos celulares para su crecimiento y las infecciones mixtas limitaron su estudio. Además, las técnicas moleculares que se han empleado para el diagnóstico y estudio de los virus de abeja sólo detectan virus de los que previamente se conoce su secuencia. Por tanto, la metagenómica ofrece una oportunidad única para el estudio de los virus implicados en la pérdida de colmenas. En el objetivo 2 de esta tesis doctoral se empleó un enfoque metagenómico para estudiar los virus presentes en una muestra de una colonia que presentaba síntomas de SDC en un colmenar de Navarra. Se detectaron tres virus de abeja en la muestra, ALPV, IAPV y LSV. Aunque ya había sido descrita en EEUU, este es el primer estudio donde se ha detectado la existencia de una variante de ALPV con la capacidad de infectar abejas en Europa. Al igual que ALPV, LSV es un grupo de virus aun sin clasificar de los que se desconoce su impacto en el estado sanitario de la colonia, siendo también la primera vez que son detectados en Europa. Además, se realizó un análisis filogenético del virus IAPV detectado en la muestra, en el que se determinó su similitud con la variante previamente descrita en Andalucía y otras secuencias descritas en Francia, lo cual podría explicarse por su proximidad geográfica. Por último, este estudio reveló que las abejas pueden ser portadoras de un virus de planta, el virus del mosaico del nabo (TuRSV), adquiriendo este virus potencialmente a través del polen.

➤ **Artículos científicos:**

Granberg, F.*, **Vicente-Rubiano, M.***, Rubio-Guerri, C., Karlsson, O., Kukiela, D., Belák, S., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2013). Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Spanish Honeybees: Co-infection by Aphid Lethal Paralysis, Israel Acute Paralysis and Lake Sinai Viruses. PLoSOne 8(2): e57459. doi:10.1371/journal.pone.0057459. * Primeros autores.

➤ **Artículos no indexados:**

Rubio-Guerri, C; **Vicente-Rubiano, M**; Sánchez-Vizcaíno, JM. (2012). Metagenómica, la técnica que 'descubre' nuevos virus. COLVEMA- Profesión Veterinaria.

Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Spanish Honeybees: Co-Infection by Aphid Lethal Paralysis, Israel Acute Paralysis and Lake Sinai Viruses

Fredrik Granberg^{1,2,*}, Marina Vicente-Rubiano^{3,9}, Consuelo Rubio-Guerri³, Oskar E. Karlsson^{1,2,4}, Deborah Kukiela³, Sándor Belák^{1,2,5}, José Manuel Sánchez-Vizcaino³

1 Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health (BVF), Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Sweden, **2** The OIE Collaborating Centre for the Biotechnology-based Diagnosis of Infectious Diseases in Veterinary Medicine, Uppsala, Sweden, **3** Animal Health Department, Faculty of Veterinary, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, **4** SLU Global Bioinformatics Center, Department of Animal Breeding and Genetics (HGEN), SLU, Uppsala, Sweden, **5** Department of Virology, Immunobiology and Parasitology, VIP, National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden

Abstract

The situation in Europe concerning honeybees has in recent years become increasingly aggravated with steady decline in populations and/or catastrophic winter losses. This has largely been attributed to the occurrence of a variety of known and “unknown”, emerging novel diseases. Previous studies have demonstrated that colonies often can harbour more than one pathogen, making identification of etiological agents with classical methods difficult. By employing an unbiased metagenomic approach, which allows the detection of both unexpected and previously unknown infectious agents, the detection of three viruses, Aphid Lethal Paralysis Virus (ALPV), Israel Acute Paralysis Virus (IAPV), and Lake Sinai Virus (LSV), in honeybees from Spain is reported in this article. The existence of a subgroup of ALPV with the ability to infect bees was only recently reported and this is the first identification of such a strain in Europe. Similarly, LSV appear to be a still unclassified group of viruses with unclear impact on colony health and these viruses have not previously been identified outside of the United States. Furthermore, our study also reveals that these bees carried a plant virus, Turnip Ringspot Virus (TuRSV), potentially serving as important vector organisms. Taken together, these results demonstrate the new possibilities opened up by high-throughput sequencing and metagenomic analysis to study emerging new diseases in domestic and wild animal populations, including honeybees.

Citation: Granberg F, Vicente-Rubiano M, Rubio-Guerri C, Karlsson OE, Kukiela D, et al. (2013) Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Spanish Honeybees: Co-Infection by Aphid Lethal Paralysis, Israel Acute Paralysis and Lake Sinai Viruses. PLoS ONE 8(2): e57459. doi:10.1371/journal.pone.0057459

Editor: Amit Kapoor, Columbia University, United States of America

Received: May 28, 2012; **Accepted:** January 24, 2013; **Published:** February 27, 2013

Copyright: © 2013 Granberg et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was mainly supported by the Award of Excellence (Excellensbidrag), provided to SB by the Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), and an FPU grant from the Ministry of Education, Culture and Sports of Spain, which supported MVR and CRG. Special recognition is given to the Ministry of Education of Spain for the FPU grant of Consuelo Rubio-Guerri and Marina Vicente-Rubiano. The work was also partly supported by/executed in the framework of the EU-project AniBioThreat (Grant Agreement: Home/2009/ISEC/AG/191) with the financial support from the Prevention of and Fight against Crime Programme of the European Union, European Commission - Directorate General Home Affairs. This publication reflects the views only of the authors, and the European Commission cannot be held responsible for any use, which may be made of the information contained therein. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fredrik.granberg@slu.se

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

In recent years, the world's population of honeybee (*Apis mellifera*), the main insect pollinator in the USA and Europe, has been decreasing. This loss of bee population has been called Colony Collapse Disorder (CCD), defined as the disappearance of bees from the beehives without any dead bees around the affected hives, presence of abundant breeding cells, pollen, and honey despite a small population of adult bees and without any characteristic symptom of disease [1]. The importance of this phenomenon stems not only from the large direct losses of honey-producing countries, of which Spain has the largest honey production in the European Union (EU) and EU ranks third in the world honey production CCD may also cause indirect losses for a lack of crop pollination, some of them very important in Spain such as citrus crop. To illustrate the serious effects of

honeybee decline, which is the most efficient pollinator of most crops [2], the global value of insect pollination has been estimated at US\$ 212 billion (€153 billion), which represents about 9.5% of the total value of agricultural production. Specifically, the value of insect pollination to agriculture for EU25 is US\$ 19.8 billion (€14.2 billion) [3]. As a result, the CCD phenomenon has become a growing concern for governments and international organizations, which have led to increased investments in terms of research on its origin.

The manifestations of increased honeybee mortality and decline of managed hives due to unclear diseases, such as CCD, have to a great extent been associated with viral infections [4,5]. At least 18 different viruses with the ability to infect honeybees have so far been identified [6,7], and an additional four were recently suggested [8]. Several of them have been demonstrated to have a global spread [9,10] and colonies frequently suffer from multiple

viral co-infections [11–14]. In addition, since most of the honeybee viruses tend to persist as covert infections with no obvious symptoms, requiring stress to be activated [15] even seemingly healthy colonies can harbour a variety of potentially harmful viral infections [16,17]. Among the natural activation factors, especially mite infestations have been correlated with outbreak of disease. The parasitism is believed to induce virus proliferation by causing a general decline in immune capacity of the hosts and mites have also been shown to act as vectors of honeybee viruses [18–20].

Regarding the above listed serious problems and losses, there is a high need to investigate the occurrence, emergence and effects of various pathogens in the European honeybee populations, with special regard to known and “unknown”, emerging new viruses and to the combination of various agents in complex infections. For the time being, the direct diagnosis of the various disease forms is based on two main approaches: a) traditional diagnostic methods, such as virus isolation and electron microscopy; b) molecular diagnostic methods, such as PCR and microarrays, among others.

The traditional paradigm of detecting and identifying pathogens relies upon diagnostic tests available for the detection of known agents. This makes it difficult, or impossible, to identify unexpected or novel pathogens by using conventional methods.

Virus isolation has a very powerful diagnostic capacity, considering that this method is able to detect a very wide range of viruses directly, in a single system. However, even this excellent method has many weaker sides, e.g., the inability of many viruses, including honeybee viruses, to replicate in the used cell cultures and cause visible signs of virus replication, such as cytopathic effects.

Molecular diagnostic techniques, such as PCR, isothermal amplification, and microarrays have rapidly been replacing the traditional diagnostic approaches and have opened new alternatives for virus detection and identification. However, even these methods have important weak sides, such as the restricted detection range. The detection range can be improved by the application of wide range microarrays, DNA-chips, however, even these system may fail to detect a wide range of pathogens, for example “unknown”, emerging new viruses. Considering that many of these viruses may cause severe diseases, malfunctions, synergetic effects with other pathogens, may influence the immune system, and many other effects, it is crucial to improve our diagnostic capacities and to extend our detection capacities.

The introduction of viral metagenomics has opened up a new range of possibilities for the improved detection of both known and unknown viruses. These cell culture and nucleotide sequence independent approaches allow the detection of a very wide range of viruses and other pathogens and they have the capacity to determine the entire infectious flora in different host species. Furthermore, viral metagenomics is able to shed light not only of the presence of various infectious agents, but also on the biodiversity of the detected viruses, bacteria and other infectious agents. This enables us to achieve a better understanding of emerging novel diseases and the complex infection biology of various disease complexes. The comprehensive metagenomic techniques, such as high-throughput nucleotide sequencing, have the potential to detect the full spectrum of emerging new pathogens, including novel viruses and fastidious bacteria, as demonstrated and reviewed [21–24]. The *OIE Collaborating Centre for the Biotechnology-based Diagnosis of Infectious Diseases in Veterinary Medicine* in Uppsala, Sweden has established skills and state-of-the-art facilities for the metagenomic detection of various known and unknown viruses, such as novel bocaviruses, Torque Teno viruses, astroviruses and other infectious agents [25–27].

Given the unclear diagnosis of many honeybee viral diseases, the frequent covert infection of these viruses and the high prevalence of multiple viral co-infections, we hypothesize that a metagenomic approach should be particularly useful to find various potentially causative agents in the bee colonies. This has also been demonstrated by previous studies aimed at characterizing the microflora, or microbiome, of the honeybee in search of microbial agents involved in CCD [4,8]. In this study, honeybees from Spain were investigated using a high-throughput sequencing approach to identify all potential etiological agents.

Materials and Methods

Specimens

The sample of honeybees (*Apis mellifera*) was collected with the owners' permission from one colony belonging to one apiary of 25 commercial hives located in Los Arcos, Navarre, North of Spain. The colony was sampled by the veterinary services due to lack of vitality of adult worker honeybees and unusual depopulation, especially in the brood frames. Furthermore, symptoms compatible with CCD such as drastically reduced adult population in presence of abundant food and breeding were observed. There were no specific symptoms compatible with viral diseases. The sample consisted of approximately 50 adult worker bees from inside and outside the hives to ensure the presence of young and adult bees. The bees were collected in sterile containers and frozen until delivered to the Department of Animal Health at the Complutense University of Madrid for routine testing with standard RT-PCR assays for identification of common bee viruses. Homogenates were manually prepared from 20 whole bees, in a 30 ml Wheaton glass homogenizer containing 6 ml of sterile phosphate-buffered saline (1×PBS).

The sample was analyzed by amplification of virus-specific nucleic acid for the presence of seven honeybee viruses: Deformed Wing Virus (DWV), Black Queen Cell Virus (BQCV), Sacbrood Bee Virus (SBV), Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), Kashmir Bee Virus (KBV) and Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV). One step real time RT-PCRs based on SYBR-Green dye were carried out, following previously described protocols [13,28–31]. The sample tested positive for IAPV and the viral load was estimated to be 7.5×10^4 genome equivalent copies (GEC) per bee.

Sample Preparation and Nucleic Acid Isolation

The homogenates were centrifuged at 4,000 rpm for 10 min and the collected supernatants were syringe-filtered through disposable 0.45 µm PVDF filters (Millipore). Aliquots of 200 µl supernatant in a final concentration of 1×DNase buffer were nuclease treated with 400 U/ml DNase I (Roche Applied Science) and 8 µg/ml RNase A (Invitrogen) at 37°C for 2 h. DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's spin protocol for blood and body fluid. RNA was isolated using TRIzol LS Reagent (Invitrogen) and further purified using the RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

Tag Labeling and Random Amplification

Extracted DNA and RNA were separately labeled with an identical sequence tag contained in the primer FR26RV-N (GCCGGAGCTCTGTCAGATATCNNNNNN) [32]. For the labeling of DNA, 10 µl of template was mixed with 1.5 µl 10× NEBuffer 2, 1.5 µl dNTPs (10 mM of each), and 2 µl FR26RV-N (10 mM). The mixture was denatured at 94°C for 2 min and chilled on ice before the addition of 0.5 µl (2.5 U) 3'–5' exo-

Klenow DNA polymerase (New England Biolabs). The initial extension at 37°C for 1 h was followed by an identical second cycle, starting with denaturation as above, after which the enzyme was inactivated by heating at 75°C for 10 min. The synthesis of the sequence tagged cDNA was prepared by adding 1.5 µl dNTP (10 mM of each) and 2 µl FR26RV-N (10 mM) to 10 µl of RNA template. The mixture was incubated at 65°C for 5 min and chilled on ice before the addition of 4 µl 5× First-Strand buffer (Invitrogen), 1 µl DTT (100 mM), 1 µl (40 U) RNaseOUT (Invitrogen) and 1 µl (200 U) Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). The RT reaction was incubated at 25°C for 5 min, 50°C for 1 h and 70°C for 15 min, after which it was chilled on ice. Second-strand synthesis was performed by adding 0.5 µl (2.5 U) 3′–5′ exo- Klenow DNA polymerase (New England Biolabs) and incubate at 37°C for 1 h. A final incubation at 75°C for 10 min inactivated the enzyme.

Amplification was performed by PCR using the complementary primer FR20RV (GCCGGAGCTCTGCAGATATC) [32]. Each 50 µl reaction was carried out with 2.5 µl of labeled template and 0.5 µl (2.5 U) Ampli-Taq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) in a final concentration of 1× GeneAmp PCR buffer 2 (Applied Biosystems), 0.2 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, and 0.8 µM FR20RV. The thermal cycling was initiated with a denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 1 min, 58°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen), both before and after the tag sequence was removed with EcoRV (New England Biolabs), according to the manufacturers' instructions. The final products were checked on agarose gel and quantified using a NanoDrop ND-100 spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

Library Preparation and Sequencing

The library preparation and sequencing were performed at the SNP&SEQ Technology Platform in Uppsala. Briefly, the amplification products were pooled and separated into two size fractions of approximately 250–400 bp and 400–550 bp, respectively. Each fraction was labeled, without any further fragmentation, with an indexing sequence using GS FLX Titanium Rapid Library MID Adaptors (Roche) and sequenced on 1/16 of a GS FLX Titanium PicoTiterPlate (Roche/454 Life Sciences) according to the manufacturer's protocol.

Data Handling and Bioinformatics

The sequence data, trimmed of adaptor regions and in Standard Flowgram Format (SFF), were combined into a single FASTA and quality file using the `sff_extract` python application distributed with the MIRA software package (<http://sourceforge.net/projects/mira-assembly>). All sequence reads were then assembled using MIRA [33] with the standard settings for *de novo* assembly of 454 data.

Taxonomic classification of unassembled sequence reads was enabled by BLASTN and BLASTX searches against local copies of NCBI's nucleotide and protein databases using NCBI's blastall program [34] with default settings. The resulting outputs were committed into MEGAN 4 [35] with the NCBI taxonomy data for assigning taxa. Each sequence read was placed on a node in the NCBI taxonomy according to the lowest common ancestor (LCA) based on a subset of the best scoring BLAST matches. The parameters for the LCA algorithm were: Min support 5, Min Score 65, Top Percent 10, and Min complexity 0.3. Resulting trees were explored for host genome, bacterial content and viral community.

Evaluating the taxonomic data for potential pathogens, candidate reference genomes were identified and retrieved from GenBank in FASTA format. Alignment of matching contigs from the whole assembled dataset against the nucleotide sequences of the reference genomes were performed using the CodonCode Aligner software (CodonCode Corporation). This allowed analysis of similarities and visualisation of gaps.

Confirmation and Retrieval of Near Full Genome Sequences

Based on the results from the alignments, PCR primers were designed to confirm the presence of viruses in the original material and to close gaps using the Primer3 program [36]. Total RNA was extracted from filtered homogenate as above, but without nuclease treatment, and cDNA was generated using the Superscript III first-strand synthesis system (Invitrogen) with random hexamers according to the manufacturer's instructions. Products with an expected length shorter than 1.500 bp were amplified with an AmpliTaq Gold-based PCR protocol (Applied Biosystems), while the Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase system (Thermo Scientific) was used for longer fragments. The amplified products were size-separated on an agarose gel, purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), and sent for sequencing (Macrogen Europe). The obtained sequences were incorporated into the alignments against the reference genomes using the CodonCode Aligner software (CodonCode Corporation). Longer distances were covered by iterative primer walking. The resulting viral sequences reported in this paper have been deposited in GenBank.

Comparison between Sequences and Phylogenetic Analysis

Direct comparisons between two sequences on a nucleotide and amino acid level were performed by using the NCBI's BLAST 2 sequences tool [37]. To enable multiple species and strain comparisons, annotated sequences were retrieved from GenBank in FASTA format. While the complete sequences were directly used for phylogenetic analysis, the partial were aligned against a reference genome using the CodonCode Aligner software (CodonCode Corporation). By using the genomic region with the highest number of overlaps, a maximum number of strains were allowed to be compared. The analysis of the phylogenetic relationships were conducted in MEGA 5 [38] using Clustal W [39] to align the sequences and the Maximum Likelihood method with 1.000 bootstrap replicates to generate the trees [40]. The Kashmir Bee Virus (KBV), which is a *Dicistroviridae* member genetically closed to IAPV [41], was used as outgroup.

Results

Sequence Data and Assembly

GS FLX Titanium sequencing (Roche/454 Life Sciences) of the nuclease treated and amplified sample returned 161.170 reads for the short fraction (250–400 bp) and 80.790 for the long (400–550 bp). For *de novo* assembly using MIRA, both fractions were combined resulting in a total of 241.960 reads and 54,98 Mbp of sequence data. The assembly generated 6.350 contigs, ranging in length from 40 to 2.945 bp with mean length 393,3 bp and an average GC content of 51,1%.

Taxonomic Classification

The assignment of unassembled sequence reads to taxa based on BLASTN results revealed bacteria to be the largest taxonomic

group. Most of the 110,137 reads in this group mapped to Gammaproteobacteria, but the presence of Alpha- and Betaproteobacteria, Bacilli (Firmicutes), Actinobacteria, and Bacteroidetes were also indicated, see Figure 1a. No bacterial pathogens, such as *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius* or *Spiroplasma* were detected. Thus, the observed bacterial diversity is similar and in agreement with results from metagenomic studies aimed at characterizing the normal gut flora of honey bees [42,43]. Among the reads in Eukaryota, 918 corresponded to the host organism *Apis mellifera* and related species, which constitute only 0,38% of the total amount of reads. This indicates that most of the host nucleic acid was removed during the sample preparation step. Furthermore, no matches against mites, such as *Varroa destructor*, or pathogenic fungi, such as certain members of *Nosema*, were detected in the eukaryotic group. A total of 4,310 reads were taxonomically assigned to viruses, the majority belonging to ssRNA viruses. Even though we used a relatively low threshold for allowing assignment, a large number of reads still displayed too short homologies to be uniquely defined and were classified as “Not assigned”. In addition, for 2,194 reads, no hits were found in the NCBI database, and 21,961 were disregarded due to low complexity of the reads. Remaking the taxonomic assignment based on BLASTX searches resulted in a similar distribution as described, the main difference being that approximately 10% of the reads were moved from the not assigned group into bacteria. Even so, no bacterial pathogens were identified.

Detected Viral Genomic Sequences

As illustrated in Figure 1b, most of the sequence reads in the virus group were divided between four viruses. While both ALPV and IAPV are members of the *Dicistroviridae* family, Turnip Ringspot Virus (TuRSV) and Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV) are plant-infecting viruses belonging to the families *Secoviridae* and *Tymoviridae*, respectively. Low numbers of reads with similarities to Lake Sinai Virus (LSV), retro-transcribing viruses and bacteriophages were also identified.

For each of the specific viruses, a best matching candidate reference genome was retrieved to enable direct comparisons against all assembled contigs. The resulting alignments revealed regions of high sequence coverage and the total numbers of contigs and reads for each virus are summarized in Table 1. In general, the number of sequence reads for a particular virus is proportional

Table 1. Identified ssRNA viruses with family classifications and numbers of aligned sequences.

Virus	Virus Family/Taxa	Reads	Contigs
Aphid lethal paralysis virus (ALPV)	<i>Dicistroviridae</i>	664	16
Israel acute paralysis virus (IAPV)	<i>Dicistroviridae</i>	1,048	7
Lake Sinai virus (LSV)	Unclassified	14	1
Turnip ringspot virus (TuRSV)	<i>Secoviridae</i>	1,968	14
Turnip yellow mosaic virus (TYMV)	<i>Tymoviridae</i>	563	1

doi:10.1371/journal.pone.0057459.t001

to its abundance in the investigated sample. However, the size of the genome and similarity with existing reference genomes can be confounding factors. This makes it hard to judge the lower amount of reads for LSV.

Regarding the indicated presence of retro-transcribing viruses, two contigs were generated and both displayed a high degree of similarity with Moloney murine leukemia virus and Xenotropic Murine Leukemia Virus (XMLV). However, attempts to amplify a larger fragment spanning the gap between the contigs by PCR failed to generate a product (data not shown). Given the dubious findings of XMLV in many different biological samples [44], it is likely that the findings indicate the presence of contaminants [45] rather than a gammaretrovirus.

A Virus Similar to Aphid Lethal Paralysis Virus (ALPV)

The 16 contigs displaying similarity with ALPV were distributed in four non-overlapping clusters, spanning a total of 1,469 nt, as demonstrated by alignment against the first complete ALPV genome that was published (GenBank AF536531). Using the consensus sequences of the clusters as starting points, PCR primers were designed in order to fill the gaps by Sanger sequencing and longer distances were bridged by primer walking. This resulted in a single 9,327 nt sequence (GenBank JX045858) covering approximately 95% of the ALPV genome. While the nucleotide

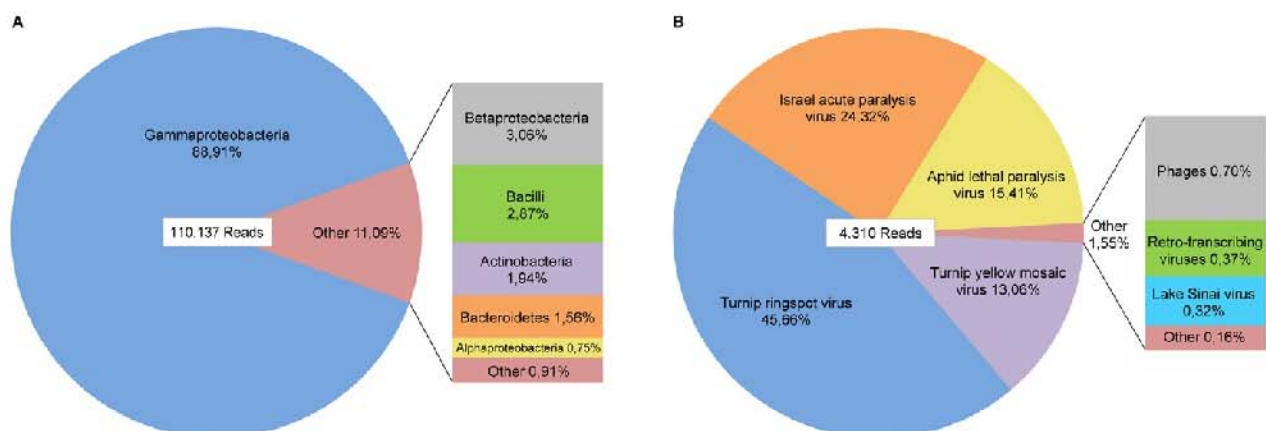


Figure 1. Taxonomic distributions. The distribution of sequence reads within the taxonomic groups of (a) bacteria, and (b) viruses. The taxonomic assignment was performed based on the BLASTN search results using the MEGAN 4 software with the following LCA settings: Min support 5, Min Score 65, Top Percent 10, and Min complexity 0.3.
doi:10.1371/journal.pone.0057459.g001

homology with the reference genome, as shown by BLAST, was 82%, the recovered sequence displayed an even closer resemblance, 96%, to the recently published ALPV strain Brookings (GenBank HQ871932). Unlike the classical ALPV, which has not yet been associated with infections of honeybees, the Brookings strain was first found in diseased honeybees using a next generation sequencing approach [8]. However, due to the relatively high resemblance with the reference sequence, the question whether or not the new strain constitutes a novel species was left unanswered. A comparison at the protein level, translated DNA against protein sequences, demonstrated that the non-structural polyprotein sequence recovered in this study aligned with 91% amino acid identity to the reference genome and 99% to the Brookings strain. It thus appears likely that we have identified the first European member of a subgroup of ALPV being able to infect honeybees and putatively causing disease.

A Novel Variant of Israel Acute Paralysis Virus (IAPV)

Using the closest blast hit as reference sequence (GenBank EU224279), the seven contigs corresponding to IAPV were aligned into three non-overlapping clusters, covering 816 nt in total. A longer continuous sequence was obtained in a similar manner as above, resulting in a stretch of 8.882 nt (GenBank JX045857) representing approximately 93% of the IAPV genome. The sequence was compared against all publicly available complete IAPV genomes deposit in GenBank. As shown in Figure 2a, the IAPV identified in this study had the highest resemblance to the Australia strain and was more similar to the strains from United States than the ones from Israel and China. In an extended phylogenetic analysis, a stretch of approximately 700 nt from the IGR, containing RNA polymerase and structural polyprotein genes, was chosen to compare the obtained sequence to 67 IAPV strains with publicly available nucleotide sequences. The IGR region of the IAPV genome also contains an independent internal ribosome entry site (IRES) and has proven suitable for the inference of phylogenetic relationships in previous studies [4,30]. Alignment and clustering indicated that the IAPV identified in this study shared more similarity with strains from France [46], as illustrated in Figure 2b, than the only strain previously identified in Spain (GenBank FJ821506) [47]. At a nucleotide level, the 700 nt of the obtained sequenced displayed 96% similarity to the Spanish strain and 99% to the French. This indicates that the virus is a variant of IAPV with close resemblance to already sequenced strains. Moreover, the high degree of similarity to the strain previously identified in France is correlating well with the geographic proximity.

A Virus Similar to Lake Sinai Virus (LSV)

A single contig of 631 nt (GenBank JX045859) indicated the presence of a virus similar to LSV, which was only recently discovered [8]. The gene organization of LSV has been described to resemble the genome of Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV). However, only a low degree of similarity is retained between LSV and CBPV at the gene level, e.g. the Orf1 genes only display 18% amino acid identity. As demonstrated by blast analysis, the best match for the recovered contig is the Orf1 region of LSV1 (GenBank HQ871931) and LSV2 (GenBank HQ888865), and the nucleotide similarity is 78 and 77%, respectively. Since only one contig was obtained, iterative primer walking could not be applied to obtain a longer sequence. Nevertheless, the presence of the contig sequence in the original sample was verified by PCR and Sanger sequencing. On an amino acid level, a similar comparison revealed that the contig shared 87 and 80% max identity with LSV1 and LSV2, respectively. This indicates that we have made

the first observation of a virus within the same group as LSV outside of the United States.

Turnip Ringspot Virus (TuRSV) & Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV)

Aligning the contigs corresponding to TuRSV against the closest BLASTN match, isolate Toledo segment RNA 1 (GenBank FJ712026), resulted in three non-overlapping clusters with a combined length of 1.169 nt (GenBank JX045854-6). A direct comparison of these clusters with the reference genome revealed that the nucleotide sequence similarity was approximately 90 to 94%. The presence of TuRSV in Spain has previously been established [48], but the published sequence do not overlap with the contigs making a direct comparison impossible (GenBank AJ489259). For TYMV, one contig of 225 bp was generated and it shared 91% nucleotide sequence similarity with its most similar reference genome (GenBank X07441), but only over a stretch of 56 bp in the middle. Since the ends did not show any resemblance with the reference, this could either indicate a new type of TYMV-like virus or an incorrectly assembled contig. As only one short contig of uncertain nature was obtained, we did not proceed to verify this finding. Although likely to be associated with pollen and nectar, honeybees have not explicitly been shown to be a vector for the spread of TuRSV or TYMV.

Discussion

The high occurrence of co-infections in colonies and honeybees has made it desirable to investigate multiple pathogens when attempting to identify the causative etiological agents in the known and in the recently emerging, “unknown” infectious diseases of the various populations. The detection of known and “unknown” infectious agents has recently been greatly facilitated by the application of metagenomic approaches, exploiting the emergence of high-throughput sequencing techniques, which allows the simultaneous detection and characterization of various micro-organisms, including bacteria, viruses, fungi and parasites. Using this type of unbiased metagenomic approach, we here identified and confirmed the presence of three viruses, ALPV, IAPV and LSV, in honeybees from Spain. The existence of a subgroup of ALPV with the ability to infect bees was, together with LSV, only recently reported [8]. Thus, according to our knowledge, this is the first identification of these strains in Europe. Interestingly, this study revealed not only bee viruses in the examined honeybee sample, but also a plant pathogen, TuRSV.

Viruses affecting honeybees have been demonstrated to have a wide spread within the pollinator community. For instance, ABPV has been described to cause covert infections in bumble bee species and KBV has been detected in both bumble bees and wasps [49,50]. In addition, a more in-depth study to investigate the host range and transmission of common honeybee viruses, such as IAPV and BQCV, found that these viruses are disseminating freely among the pollinators via the flower pollen itself [51]. The same study also revealed that non-*Apis* hymenopteran pollinators near honeybee apiaries affected by IAPV were more likely to carry the virus themselves. There are thus several potential reservoirs for these viruses in nature, which motivates the inclusion of other pollinators when conducting prevalence studies of honeybee viruses.

Until recently, no virus similar to ALPV on the sequence level had been reported in association with honeybees. This was changed, soon after this study began, with the finding of the Brookings strain in the United States, where the initial discovery also enabled the virus to be retroactively detected in honeybee

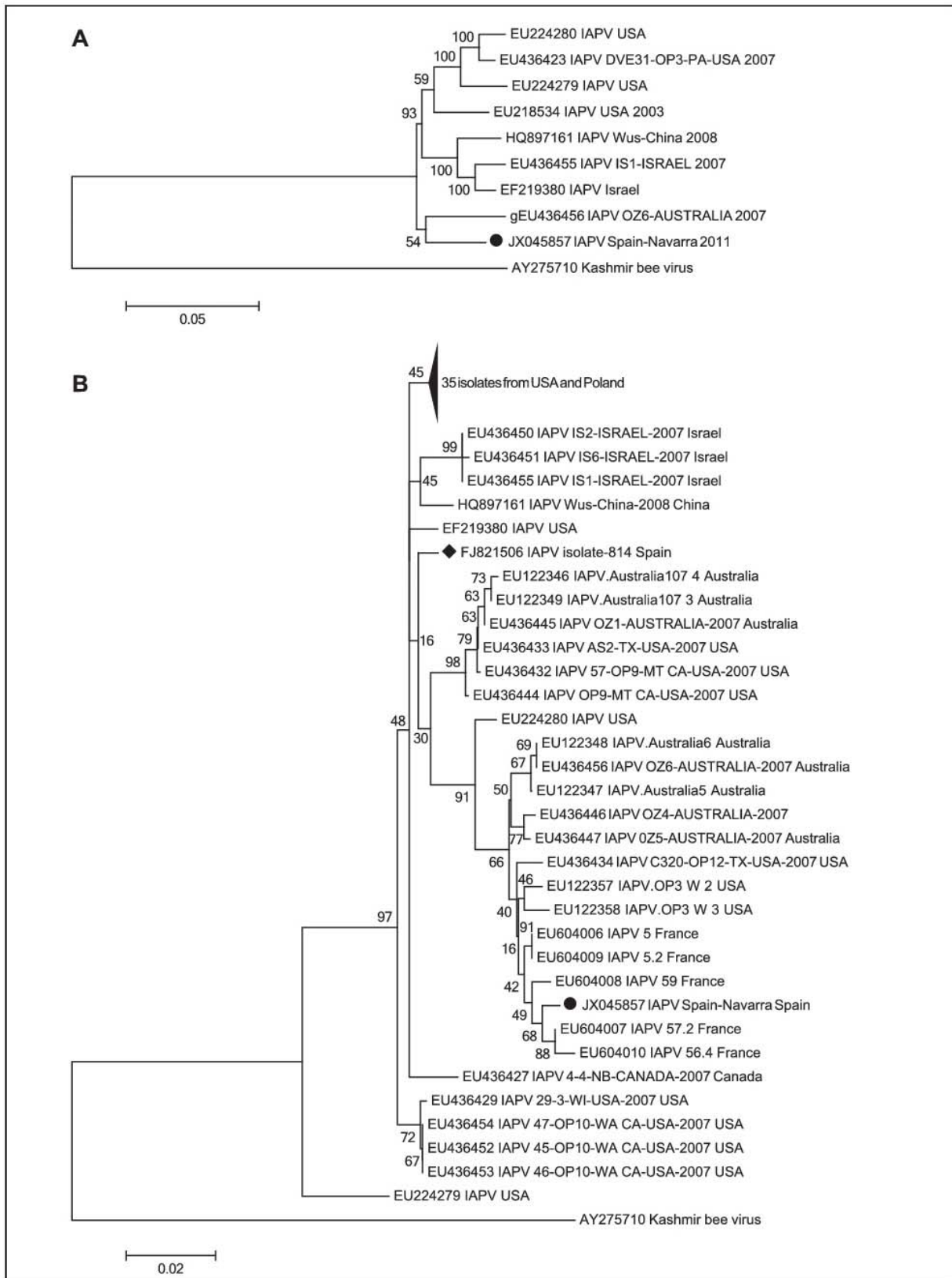


Figure 2. Phylogenetic relationships between strains of IAPV. The trees were based on (a) near full-length genomes, and (b) a 700 nt region (the upper part, containing genetically similar strains from USA and Poland, has been collapsed for clarity). The analyses were conducted in MEGA 5 using Clustal W alignment and the Maximum Likelihood method (bootstrap resampling 1.000 times). The Kashmir bee virus was used as outgroup. The IAPV identified in this study is denoted by (●) and the strain previously identified in Spain with (◆). doi:10.1371/journal.pone.0057459.g002

samples from multiple geographic locations collected during the course of several months [8]. The frequent detection made the authors conclude that the virus is not just passively being transported together with forage (nectar and pollen) from flowers shared with other insects. However, they could not associate infection by the Brookings strain to any specific symptoms and called for further studies to determine whether the virus is commensal, using honeybees as vector, or a pathogen.

We here report the first finding and description of an ALPV-like virus in honeybees from Europe. Even though the pathogenicity of ALPV in honeybees thus remain unknown [52], the high sequence similarity to the Brookings strain makes it reasonable to assume that the viruses affect their hosts in a similar manner. Given the frequent occurrence of the Brookings strain in the United States and the discovery of an almost identical virus in Europe, further studies of these ALPV-like viruses are highly motivated. A first step would be to conduct further prevalence studies, both in honeybees as well as related pollinators, to determine distribution and host range, as well as assessing the transmissibility and pathogenicity.

In agreement with the initial correlation of IAPV with CCD [4], it has been demonstrated that specific treatment against IAPV can improve the health of affected colonies [53]. However, causative relationship between IAPV presence and CCD has not been established yet and IAPV has also been reported to exist in many hives with no symptoms of CCD around the world [46,54], including Spain [55]. The variant of the virus detected in this study shared most similarity with a strain identified in France during an attempt to correlate IAPV with increased colony mortality [46]. Furthermore, the French strain was phylogenetically demonstrated to belong to a sub-lineage comprised of IAPV isolates from apparently healthy bees. In our extended analysis, a similar division was observed, indicating that this IAPV variant might belong to a group of viruses unable to cause overt infections in affected bees and hence, unable to cause CCD alone.

For its part, Lake Sinai virus has only been described in the USA, and this is the first time that it is described in honeybees from Europe. Related to CBPV and the *Nodaviridae* family, the pathogenic implication and the epidemiological relevance remains unknown, despite the fact that LSV could be one of the honeybee viruses previously described by serology or electron microscopy for which no molecular information is available (Bee virus X and Y, Arkansas bee virus and Berkeley bee virus) [8]. More studies should deepen the knowledge and understanding of this honeybee virus.

The finding of TuRSV through the metagenomic approach indicates the presence of this plant virus in the bee samples, but does not provide sufficient information yet on the reason why this plant virus is present in the homogenised bee organs. It is likely that the bees are passively carrying the plant viruses, e.g., in infected pollen particles attached to their body, and it does not seem to be likely that active plant virus replication would occur in the bodies of the bees. However, further investigations are surely required to clarify exactly the infection biology of this scenario. Even these initial results clearly indicate that the honeybees are

potentially serving as important vector organisms for transmitting infections from plant to plant.

Given the results, it would have been of interest to perform a follow-up of the sanitary status of the studied colony. Unfortunately, this could not be specifically performed as it was a commercial hive and beekeepers often use new brood frames from healthy colonies to avoid the death of the weak colony. However, the apiary did not present any other problem of depopulation and weakening of colonies in the following years, indicating an improvement of the sanitary status of the colonies.

Taken together, these results serve to illustrate the new possibilities offered by metagenomic analysis, including general amplification, high-throughput sequencing and bioinformatic analysis, to allow investigation of whole virome or microbiome in search of unexpected and previously unknown etiological agents. Our investigation of a colony with CCD-like symptoms revealed that it was not only co-infected by two dicistroviruses and by one unclassified virus, but it also harboured a plant virus. This finding can be compared with standard diagnostic methods, i.e. RT-PCR assays. However, due to their principles and limitations, the PCR methods were able to ascertain exclusively the presence of IAPV. The extensive information obtain by a metagenomic approach is thus of great value when trying to understand multifactorial diseases, such as CCD. Considering the importance of honey bees in agriculture, it is also noteworthy that we could further establish the role of honeybees as vectors of pollen-borne viruses of plants by the detection and identification of the TuRSV. Although this initial study managed to identify both a novel subtype of bee-infecting ALPV and LSV not previously reported in Europe, more studies are called for in order to establish the normal genetic and microbiomic background in bees from different geographic regions. Such information would enable comparison between metagenomic profiles from apparent healthy bees and from diseased animals, in order to provide further novel insights into the complex diseases of the honeybee.

Acknowledgments

The authors would like to thank Coordination of Agricultural and Livestock Organizations (COAG), the official veterinary services of Navarre and Navarre beekeepers for the collection of the samples. Acknowledgment is also given to Belen Rivera and Rocio Sanchez, for their technical support, to Ulrika Liljedahl and co-workers at the SNP&SEQ Technology Platform in Uppsala, for performing the GS FLX Titanium sequencing, and to Martin Norling of the SLU Global Bioinformatics Group, for assistance with bioinformatics software applications. Special recognition is given to the Ministry of Education of Spain for the FPU grant of Marina Vicente-Rubiano and Consuelo Rubio-Guerri.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FG SB JMSV. Performed the experiments: FG MVR CRG. Analyzed the data: FG OEK. Contributed reagents/materials/analysis tools: MVR SB JMSV. Wrote the paper: FG MVR CRG DK SB JMSV.

References

- van Engelsdorp D, Hayes J, Jr., Underwood RM, Pettis J (2008) A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS One* 3: e4071.
- National Research Council (NRC) (2006) Status of Pollinators in North America. Washington, DC: National Academy of Sciences.
- Gallai N, Salles J-M, Settele J, Vaissière BE (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68: 810–821.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, et al. (2007) A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318: 283–287.
- Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH, Stanford MF, Zulich AW, et al. (2010) Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS One* 5: e13181.
- Chen YP, Siede R (2007) Honey bee viruses. *Adv Virus Res* 70: 33–80.
- Genersch E, Aubert M (2010) Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet Res* 41: 54.
- Runkel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, et al. (2011) Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia. *PLoS One* 6: e20656.
- Allen M, Ball B (1996) The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 77: 141–162.
- Ellis JD, Munn PA (2005) The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 86: 88–101.
- Chen Y, Zhao Y, Hammond J, Hsu HT, Evans J, et al. (2004) Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J Invertebr Pathol* 87: 84–93.
- Berenyi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Koglbberger H, Nowotny N (2006) Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl Environ Microbiol* 72: 2414–2420.
- Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, et al. (2004) Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and Varroa destructor mite populations in France. *Appl Environ Microbiol* 70: 7185–7191.
- Forgach P, Bakonyi T, Tapaszi Z, Nowotny N, Rusvai M (2008) Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: situation before joining the European Union. *J Invertebr Pathol* 98: 235–238.
- Di Prisco G, Zhang X, Pennacchio F, Caprio E, Li J, et al. (2011) Dynamics of Persistent and Acute Deformed Wing Virus Infections in Honey Bees, *Apis mellifera*. *Viruses* 3: 2425–2441.
- Dall DJ (1985) Inapparent infection of honey bee pupae by Kashmir and sacbrood bee viruses in Australia. *The Annals of Applied Biology* 106: 461–468.
- Anderson DL, Gibbs AJ (1988) Inapparent Virus Infections and their Interactions in Pupae of the Honey Bee (*Apis mellifera* Linnaeus) in Australia. *Journal of General Virology* 69: 1617–1625.
- Bailey L, Ball BV, Perry JN (1983) Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Annals of Applied Biology* 103: 13–20.
- Ball BV, Allen MF (1988) The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite Varroa jacobsoni. *Annals of Applied Biology* 113: 237–244.
- Brodsgaard CJ, Ritter W, Hansen H, Brodsgaard HF (2000) Interactions among Varroa jacobsoni mites, acute paralysis virus, and Paenibacillus larvae larvae and their influence on mortality of larval honeybees in vitro. *Apidologie* 31: 543–554.
- Tang P, Chiu C (2010) Metagenomics for the discovery of novel human viruses. *Future Microbiol* 5: 177–189.
- Cheval J, Sauvage V, Frangeul L, Dacheux L, Guigon G, et al. (2011) Evaluation of high-throughput sequencing for identifying known and unknown viruses in biological samples. *J Clin Microbiol* 49: 3268–3275.
- Nakamura S, Nakaya T, Iida T (2011) Metagenomic analysis of bacterial infections by means of high-throughput DNA sequencing. *Exp Biol Med* (Maywood) 236: 968–971.
- Lipkin WI (2010) Microbe hunting. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 363–377.
- Blomström AL, Belák S, Fossum C, Fuxler L, Wallgren P, et al. (2010) Studies of porcine circovirus type 2, porcine bocavirus and torque teno virus indicate the presence of multiple viral infections in postweaning multisystemic wasting syndrome pigs. *Virus Res* 152: 59–64.
- Blomström AL, Belák S, Fossum C, McKillen J, Allan G, et al. (2009) Detection of a novel porcine bocavirus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Res* 146: 125–129.
- Blomström AL, Widén F, Hammer AS, Belák S, Berg M (2010) Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol* 48: 4392–4396.
- Kukielka D, Esperon F, Higes M, Sanchez-Vizcaino JM (2008) A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J Virol Methods* 147: 275–281.
- Kukielka D, Sanchez-Vizcaino JM (2009) One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of Sacbrood honeybee and Acute bee paralysis viruses. *J Virol Methods* 161: 240–246.
- Palacios G, Hui J, Quan PL, Kalkstein A, Honkavuori KS, et al. (2008) Genetic analysis of Israeli acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States. *J Virol* 82: 6209–6217.
- Ribière M, Triboulet C, Mathieu L, Aurières C, Faucon J-P, et al. (2002) Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* 33: 339–351.
- Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, et al. (2005) Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12891–12896.
- Chevreaux B, Pfisterer T, Drescher B, Driesel AJ, Müller WE, et al. (2004) Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. *Genome Res* 14: 1147–1159.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.
- Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC (2007) MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res* 17: 377–386.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365–386.
- Tatusova TA, Madden TL (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 174: 247–250.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680.
- Felsenstein J (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- de Miranda JR, Cordoni G, Budge G (2010) The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol* 103 Suppl 1: S30–47.
- Moran NA, Hansen AK, Powell JE, Sabree ZL (2012) Distinctive Gut Microbiota of Honey Bees Assessed Using Deep Sampling from Individual Worker Bees. *PLoS One* 7.
- Engel P, Martinson VG, Moran NA (2012) Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 11002–11007.
- Weiss RA (2010) A cautionary tale of virus and disease. *BMC Biol* 8: 124.
- Sato E, Furuta RA, Miyazawa T (2010) An endogenous murine leukemia viral genome contaminant in a commercial RT-PCR kit is amplified using standard primers for XMRV. *Retrovirology* 7: 110.
- Blanchard P, Schurr F, Celle O, Cougoule N, Drajudel P, et al. (2008) First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* 99: 348–350.
- Kukielka D, Sanchez-Vizcaino JM (2010) Short communication. First detection of Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV) in Spanish honeybees. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8(2): 308–311.
- Segundo E, Martín-Bretones G, Ruiz L, Velasco L, Janssen D, et al. (2003) First Report of Turnip mosaic virus in Pisum sativum in Spain. *Plant Disease* 87: 103–103.
- Ward L, Waite R, Boonham N, Fisher T, Pescod K, et al. (2007) First detection of Kashmir bee virus in the UK using real-time PCR. *Apidologie* 38: 181–190.
- Anderson DL (1991) Kashmir bee virus: a relatively harmless virus of honey bee colonies. *American Bee Journal* 131: 767–770.
- Singh R, Levitt AL, Rajotte EG, Holmes EC, Ostiguy N, et al. (2010) RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-Taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS One* 5: e14357.
- Van Munster M, Dulleman AM, Verbeek M, Van Den Heuvel JF, Clerivet A, et al. (2002) Sequence analysis and genomic organization of Aphid lethal paralysis virus: a new member of the family Dicistroviridae. *J Gen Virol* 83: 3131–3138.
- Hunter W, Ellis J, Vanengelsdorp D, Hayes J, Westervelt D, et al. (2010) Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *PLoS Pathog* 6: e1001160.
- Reynaldi EJ, Sguazza GH, Tizzano MA, Fuentealba N, Galosi CM, et al. (2011) First report of Israeli acute paralysis virus in asymptomatic hives of Argentina. *Rev Argent Microbiol* 43: 84–86.
- Garrido-Bailon E, Martín-Hernández R, Bernal J, Bernal JL, Martínez-Salvador A, et al. (2010) Short communication. The detection of Israeli Acute Paralysis virus (IAPV), fipronil and imidacloprid in professional apiaries are not related with massive honey bee colony loss in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8: 658–661.

Objetivo 3: Determinar las prácticas de manejo de las colonias que pueden influir en el efecto de las infecciones víricas sobre la salud de las colonias



RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 3

Como se ha descrito anteriormente, la mayoría de virus de abeja se encuentran en condiciones normales en infecciones encubiertas que no presentan sintomatología. Sin embargo, bajo la influencia de factores capaces de inducir a la colonia a un estado de estrés, su replicación puede activarse dando lugar a infecciones aparentes con sintomatología evidente. Por tanto, la relación virus-abeja puede verse influida por factores externos, presentes tanto en la propia colmena como en el medio ambiente que las rodea. Entre estos factores, las prácticas de manejo ejercen un efecto directo sobre las condiciones de la colmena, por lo que potencialmente pueden influir en las infecciones víricas presentes en las mismas. De este modo, entender el efecto de las prácticas de manejo sobre la dinámica de los virus en las colonias puede ayudar su optimización como estrategia en la prevención de enfermedades víricas, que pueden desencadenar el colapso de las colonias. Para entender este efecto, en el objetivo 3 se estudió las prácticas de manejo en relación con la presencia y carga de siete virus en colmenares situados en todas las provincias de Andalucía, en dos muestreos en primavera-verano y otoño-invierno. Se observó un ligero empeoramiento del estado sanitario de las colonias en otoño-invierno, coincidiendo con una mayor presencia de ascosferosis y síntomas inespecíficos como pillaje, aunque no se notificó la presencia de síntomas víricos. Se detectó la presencia de seis de los siete virus estudiados, aunque sólo BQCV y DWV se detectaron en ambos muestreos en todas las provincias. La carga de DWV aumentó a lo largo del estudio, aunque nunca se superaron las cargas del orden de 10^7 CGE/abeja y no se observaron síntomas de alas deformadas. Al estudiar las posibles asociaciones entre las prácticas de manejo y la presencia y cantidad de virus se observaron diferentes tendencias respecto a BQCV y DWV. BQCV se correlacionó positivamente con el porcentaje del año en cultivos, y se correlacionó negativamente, al igual que DWV, con el número total de colmenas. La presencia de estos dos virus también se asoció con la alimentación artificial durante el invierno y la trashumancia fuera de la provincia, lo que sugiere que estas prácticas deben ser consideradas en futuros estudios. Por otro lado, la alimentación artificial en primavera y variables relacionadas con la profesionalización del sector, como el número de colmenas o la dedicación, resultaron factores protectores para la coinfección de virus en la misma colonia. Por tanto, este estudio resalta la importancia de la profesionalización del sector y la formación en técnicas de manejo para mantener el estado sanitario de las colmenas, identificando tendencias que pueden ser la base de futuros estudios en los que basar las medidas de control sanitario para la pérdida de colonias.

➤ **Artículos científicos:**

Vicente-Rubiano M, Kukiela D, Martínez M, E, Goyache J, Sánchez-Vizcaíno JM. Beekeeping practices and bee viruses: a potential strategy to prevent colony losses. Enviado.

➤ **Ponencias en congresos:**

Vicente-Rubiano M., Kukiela D, Sánchez-Vizcaíno JM. Presence, load and distribution of seven honey bee viruses in the South of Spain and relationship with colony weakening. Annual conference of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine (SVEPM). 2013. Poster.

Beekeeping practices and bee viruses: a potential strategy to prevent colony losses

Marina Vicente-Rubiano^{1,2*}, Deborah Kukiela³, Marta Martínez^{1,2}, Joaquín Goyache^{1,2}, José Manuel Sánchez-Vizcaíno^{1,2}

1 VISAVET, Faculty of Veterinary Science, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Spain **2** Animal Health Department, Faculty of Veterinary Science, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Spain **3** Department of pharmacy and health science, Microbiology area, Pharmacy Faculty, Universidad CEU San Pablo, Madrid, Spain.

Keywords

Colony losses

Bee viruses

Beekeeping practices

DWV

BQCV

Abstract

Recent colony losses of western bee *Apis mellifera*, one of the most concerning challenges for beekeeping and related activities, have been attributed to a combination of factors. Some of these factors cause stress conditions to the colonies, which can facilitate the activation of replication of the pathogens that are already present. Specifically, viruses are usually present in apparently healthy colonies in covert infections without causing any serious damage to the colony, so their solely detection is not indicative of disease. To this respect, beekeeping practices and managing of colonies may have an effect on virus infection. In this study we have characterized the beekeeping practices in relation with the presence and load of seven bee viruses of apiaries from Andalucía, South of Spain, in two different samplings. A slight deterioration of health status was appreciated from the first to the second sampling. However, overt symptoms were rarely observed. Six of the seven viruses were detected although only black queen cell virus (BQCV) and deformed wing virus (DWV) had a clear presence in both samplings and in all the provinces. DWV increased prevalence and load along the period of study but loads were below 10^7 GEC/bee and wing deformities were not observed. Trends between beekeeping practices and virus load and presence were observed for BQCV and DWV. BQCV load was positively correlated with percentage of the year in crops and negatively correlated, together with DWV load, with total number of colonies. BQCV and DWV presence were also associated with artificial feeding during winter and transhumance to a different province, respectively, suggesting that these practices should be considered in future studies. Moreover artificial feeding in spring and professionalism have been detected as protective factors for viral coinfection. Thus, this study has shown the potential of professionalism in the maintaining of colony health and has identified trends that could serve in the design of future prospective studies and in the implementation of control measures.

Introduction

European honey bees' (*Apis mellifera* L.) importance in global economy is mainly associated to their contribution to crop pollination worldwide. Insect pollination,

which is provided predominately by honey bees, is estimated to have a value of US\$ 212 billion (1). In fact, 35% of the human diet is thought to be benefited from pollination (2,3), which means that 52 of the 115 lead global food commodities depend on honey bee pollination (2).

Honey bee populations have suffered alarming losses in recent years. As an example, managed colonies have significantly decreased in both Europe (-26.5%) and North America (-49.5%) from 1967 to 2007 (3). These losses have been attributed to winter mortality of colonies, progressive weakening, depopulation and colony collapse disorder (CCD) syndrome, which was firstly described in 2006. The main results of the studies about the causes of these losses highlight that there is a direct effect of pathogen infection, which may cause the collapse of the colony, preceded by a combination of factors responsible for the environmental stress that reduce the bees' ability to mitigate infection (4). Viruses are the most recent discovered pathogens, and have a complex relationship with both the immune system of the host and other microorganisms such as *Nosema spp.* or *Varroa destructor*, which act as mechanical/biological vectors for viral transmission. In addition, viruses such as Israeli acute paralysis virus (IAPV) (5), deformed wing virus (DWV) (6), acute bee paralysis virus (ABPV) (7), and Apis iridescent virus (AIV) (8) have been recently associated with honey bee losses *per se* or in combination with parasites. However, viruses are usually detected in apparently healthy colonies (covert infections), and their solely presence is not indicative of disease (9). Field reports have suggested that the development of overt infections is context dependent, which means that, in general, honey bees carry infections with little or no consequences, but under specific conditions, such as environmental stress, the infection may become overt and have a fatal impact at colony level (10).

Among environmental factors, beekeeping practices may have a decisive effect on the colonies and thus, optimization of these practices could determine the preservation of the health status of the colonies by maintaining the host-pathogen balance. This has been observed in previous studies which have considered beekeeping practices as potential risk factors for honey bee health and have highlighted the importance of queen age (11), colony population (11,12), size operations (13) in colony losses. Thus, optimizing the management of colonies is an essential point to preserve health status of colonies.

The aim of this study is to identify beekeeping practices related to lower presence and load of

bee viruses and which can represent a potential strategy to maintain the health of the colonies.

Material and methods

Study area

The Spanish region of Andalucía was selected to perform an extensive honey bee sampling, as it represents 17.3% of the national territory and is the first Spanish Community in hive census with up to 535.000 hives, and the second one in honey production, with 5.712 metric tons of honey produced in 2009 (14). Beekeepers from Andalucía were asked to participate in the study. Beekeepers marked their colonies so as to carry out samplings of the same colonies in two different times of the year. All provinces of Andalucía were sampled to maintain geographical homogeneity and professional, semi-professional and non-professional beekeepers were selected for the study to include differences in hives' handling and beekeeping conditions.

Sampling design

We analyzed the health status of selected apiaries in two moments of the season of beekeeping activity of 2010-2011. The first sampling took place in spring-summer 2010, between 29/3/10 and 2/7/10, when honey bees are in high collecting activity and there is abundant brood. The second sampling was performed in autumn-winter 2010/2011, when colonies reduce activity to overwinter, and took place between 19/10/10 and 31/3/11, because in that year overwintering was observed until this moment. Given the census of 3328 apiaries in Andalucía in 2011 (14), we designed the sampling assuming the worse scenario of prevalence (50%) and 95% of confidence and restricting the power of the sampling between 80 and 90%. Two colonies were sampled per apiary, assuming homogenous health status among colonies belonging to the same apiary. The same colonies were studied in two different samplings. Losses were replaced with the closest colony (i.e. nearest neighbor). Fifty worker bees were collected alive from inside and outside the hive to ensure the presence of young and adult bees and immediately frozen and sent to our laboratory.

Questionnaires

A questionnaire was designed to obtain specific data about the sampled colonies and the apiary. Questionnaires were filled in by the veterinary inspectors specialized in beekeeping at the moment of sampling. The questionnaire was structured in (i) apiary general information such as location with GPS coordinates, type of management (professional, semi-professional or non-professional) and date of sampling; (ii) beekeeping handling of colonies such as movement of colonies to pollinate crops ('transhumance'), type of feeding (crops or field nutrition) and food supplements; (iii) sanitary conditions such as symptoms of bacterial or fungal disease (foulbrood and ascosphaerosis), viral symptoms, kleptoparasitism of neighboring colonies and depopulation. Varroa presence was studied through the observation of abnormal quantities of the parasite and the number and type of treatment used against mites. Although monitoring of *Varroa destructor* loads would be an interesting parameter to measure for its relationship with bee viruses, we could not measure the natural presence of valuable quantities of the mite in the colonies. Instead, we considered the notification of problems to control Varroa as an indicator of high loads of the mite in the questionnaire.

Laboratory analyses

Seven viruses were analyzed to determine the health status of the colony: deformed wing virus (DWV), Israeli acute paralysis virus (IAPV), black queen cell virus (BQCV), acute bee paralysis virus (ABPV), chronic bee paralysis virus (CBPV), Kashmir bee virus (KBV) and sacbrood virus (SBV).

Each sample of 50 bees was homogenized in 6 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS) 1X and also conserved at -80°C in sterile 1.5 ml tubes. RNA extraction was carried out with the column commercial kit Nucleospin II Virus® (Macherey Nagel) following manufacturer's instructions and including positive controls of each bee virus. Extracted RNA was resuspended in RNases and DNase free water and conserved at -20°C until their molecular analysis.

Samples were analyzed by amplification of virus-specific nucleic acid for the presence of

seven honey bee viruses by one-step reverse-transcription real time polymerase chain reactions (RT-qPCR) based on SYBR-Green dye and using primers and PCR conditions previously described by several authors: BQCV (15), ABPV (16), CBPV (17), KBV (18), SBV (19), DWV (15) and IAPV (20) (Palacios et al. 2008) (Palacios et al. 2008) (Palacios et al. 2008) (Palacios et al. 2008) (Palacios et al. 2008) (Palacios et al. 2008). Temperature programs of each virus were run in a Stratagene Mx-Pro 3000 thermocycler and included a final extension and dissociation curve to assess the amplification of the specific target. All RT-qPCR included a positive RNA control and two water-negative controls. The reliability of the whole processing (RNA extraction to RT-PCR amplification) was evaluated by introducing a housekeeping gene 'Bee actin'. The sequence of bee actin (Accession number: AB023025.1 from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)) was used to design the primer pair Actin_2beeFWD
GGCTCTTTTCCAACCATCCT and Actin_2beeREV
GGGCAGTGATTCTTTTTC using Primer3 software (<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3-www.cgi>). Primers were previously proved for each virus RT-PCR conditions, in triplicates of dilutions from an original bee sample up to dilution 10⁻⁷. Actin was detected in all samples with similar Ct (median=28.16, mean=28.33, SD=1.88). Viral loads were quantified using absolute quantification. Amplified products of bee viruses obtained by RT-PCR were cloned into a PGemT® plasmid vector (Promega) and OneShot®TOP10 chemically competent cells (Invitrogen) following the manufacturers' instructions. Plasmids were extracted from *E. coli* competent cells with the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) and confirmed as positive to each virus by PCR. Concentrations (ng/μl) of the plasmids were measured in Nanodrop® (data not shown). Standard curves were constructed with triplicates of serial dilutions of known amounts of each plasmid. Viral load was expressed as genome equivalent copies per bee (GEC/bee) (21).

Table 1. Description of variables used to codify beekeeping practices from the questionnaires. a. spring-summer sampling, b. summer-autumn sampling. Q: quantitative, C: categorical, O: ordinal.

Name of variable	Description of variable	Type of variable
V1a, V1b	Total number of colonies handled by the beekeeper	Q
V2a, V2b	Mean number of colonies/apiary	Q
V3a, V3b	Health status score: rate of colony health status with a score of 1 (poor) to 10 (excellent)	O
V4a, V4b	Dedication: professional (1), semi-professional (2), hobby (3)	O
V5a, V5b	Feeding: % per year with crop nutrition (in contrast with field nutrition)	Q
V6a, V6b	Feed supplement during spring (yes/no)	C
V7a, V7b	Feed supplement during winter (yes/no)	C
V8a, V8b	Seasonal movement of colonies (transhumance): % of colonies that are moved and whether the movement is within the same (0) or to a different province (1)	Q, C
V9a, V9b	Varroa treatment: once (1) or twice a year (2)	C

Statistical and epidemiological analyses

Questionnaire responses were codified for each apiary as nine variables for each season (Table 1). Descriptive analyses were performed to assess beekeeping practices in the sampled apiaries.

Analyses of health data were also performed at the apiary level. An apiary was considered positive for a virus when at least one of the sampled colonies was tested positive for that virus. Similarly, the viral load considered for each apiary was the maximum viral load found in the sampled colonies of this apiary.

Evolution of viral load between spring-summer and autumn-winter seasons was statistically evaluated using non parametric Mann-Whitney U Test (M-W test) and Wilcoxon Rank Sum Test (W test). Only apiaries sampled in the two seasons (39 apiaries) were included in this analysis. Correlations between virus loads were performed using Spearman correlations in each sampling to assess for relationships between viruses. Significant correlations were then studied by curve estimation regression and R^2 parameter to determine if the observed fits into a known distribution.

The prevalence (with 95% confidence level and assuming perfect sensitivity and specificity) was based on the proportion of apiaries with at least one virus confirmed by the laboratory analysis results. To test whether

the distribution of viruses was random, the observed distribution of viruses among apiaries with 70 colonies per apiary was compared to a Poisson distribution using Chi square goodness-of-fit-tests in each season. Infection levels of apiaries were analyzed for differences among provinces with a Kruskal-Wallis test (K-W test).

Exploratory relationships between beekeeping practices and virus loads were assessed using Spearman correlations for continuous variables and Chi square and Fisher's exact tests for categorical variables in each season. In the case of categorical variables, only positive-negative values of DWV and BQCV were considered.

Coinfection of several viruses in the same apiary was studied by codifying apiaries in a Boolean variable with value 1 where more than one virus is present at the same time in the colony. Two logistic regression models using backward method were then used to assess for relationships between coinfection and beekeeping variables in the apiaries in each season.

All statistical analyses and figures were performed using EpiTools, SPSS v.21 and R language (22) in R Studio. Significant differences in statistical tests were considered when P value < 0.05 . Maps were drawn using ArcGIS version 9.3.

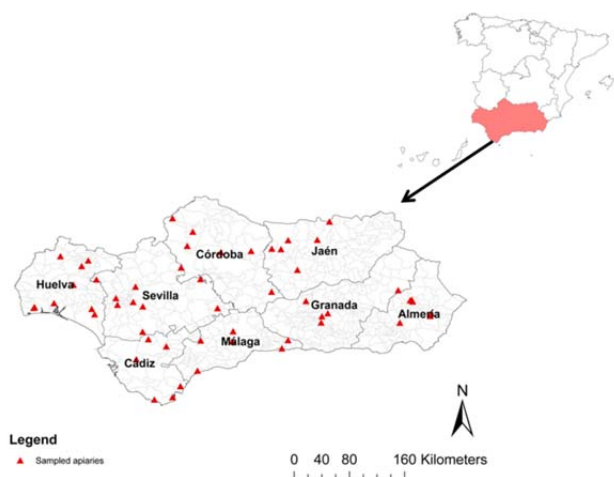


Figure 1. Location of the apiaries included in the study. Andalucía region is highlighted in green.

Results

Sampling and questionnaires

We retrieved information from 48 apiaries in spring-summer and 43 apiaries in autumn-winter in a total of 52 locations (Figure 1). In 9 apiaries the second sampling could not be performed and a new apiary was selected in the same province.

The number of apiaries per beekeeper ranged between 1 and 13, with a mean of 6 apiaries per beekeeper ($SD=2.57$). The mean number of colonies per apiary also varied, from 10 to 300, with a mean of 64 colonies per apiary ($SD=30.57$) and a median of 70 colonies per apiary. A slight deterioration of the health status of colonies was observed between samplings, as the health status score varied from 7.79 (max 9 -min 4) in spring-summer to 7.24 on average (max 9- min 4). Most of the beekeepers included in the study were professional (60.4%), whereas semi-professional beekeepers (31.25%) and non-professional beekeepers were least frequent (8.33%). Feeding on fields was frequent, as only three apiaries fed exclusively on crops. The annual average percentage of crop feeding was 26.98%. Feed supplements were frequent, particularly in spring (66.67%) although winter supplements were used by an average of 20.83% apiaries. With the exception of four beekeepers, the rest of beekeepers all moved colonies from its original location, with a mean of 49.19% of colonies moved. These movements were both local and long distance, as 43.75% of

beekeepers moved colonies out of the original province, in a medium-long distance movement. Lastly, most of the beekeepers performed only one Varroa treatment per year (79.17%) in autumn, whereas the rest of beekeepers applied a second treatment in spring. We found no statistical differences in the management practices from spring-summer to autumn-winter.

We found a positive correlation (Spearman correlation, $\rho =0.400$, $P=0.005$) between the total number of colonies per apiary and the annual percentage with crop nutrition, and also between the annual percentage with crop nutrition and the percentage of colonies that are moved (transhumance) (Spearman correlation, $\rho =0.436$, $P=0.002$). However, none of these correlations have a robust fitting of the curve ($R^2<0.4$).

No symptoms associated with bee viruses were identified in apiaries, except in one apiary in autumn-winter which showed paralyzed and darkened hairless bees, compatible with CBPV overt infection. Other symptoms observed in the apiaries were mummified brood due to ascosphaerosis (20.83% in spring-summer and 37.20% in autumn-winter) and decaying brood typical of bacterial diseases in two apiaries in autumn-winter. Problems with Varroa were only detected in one apiary in spring-summer and two apiaries in autumn-winter. Interestingly, kleptoparasitism of neighboring colonies was only observed in autumn-winter in 25.58% of apiaries, although weakening symptoms such as low bee population was not reported in any apiary.

Health status of apiaries

BQCV was present in 62.5% apiaries in spring-summer and in 58.14% apiaries in autumn-winter. However, only 16.48% of apiaries were infected with BQCV in both samplings. The apparent prevalence estimation of BQCV in Andalucía was, based on our results and with a 95% confidence level, of 48.4%-74.8% in spring-summer and of 43.3%-71.6% in autumn-winter. BQCV loads decreased from an average of 2.26×10^3 GEC/bee in spring-summer to 8.59×10^2 GEC/bee in autumn-winter.

DWV increased from 29.17% infected apiaries in spring-summer (apparent prevalence 18.2%-43.2%, 95% confidence level) to 55.81% in autumn-winter (apparent prevalence 41.1%-69.6%, 95% confidence level). However, only 6 apiaries (6.59%) were infected with DWV in both samplings. DWV loads increased from an average of 1.42×10^3 GEC/bee in spring-summer to 1.50×10^4 GEC/bee in autumn-winter.

CBPV was only present in autumn-winter (18.6% apiaries infected, apparent prevalence

9.7%-32.6%, 95% confidence level) with an average load of 4.34×10^1 GEC/bee. In contrast, IAPV was detected in 18.75% of apiaries in spring-summer and only in 4.65% apiaries in autumn-winter (apparent prevalence 10.2%-31.9%, 95% confidence level). IAPV loads decreased from an average of 1.16×10^5 GEC/bee in spring-summer to 2.09×10^2 GEC/bee in autumn-winter.

KBV was detected in two apiaries in spring-summer, with one of the apiaries very close to the limit of quantification of PCR (10 GEC/bee) and one below this limit. Similarly, SBV was detected in two apiaries in autumn-winter, but quantification was very close to the limit of the RT-PCR (10 GEC/bee). For that reason, these two viruses were excluded from further analyses. Finally, ABPV was not detected in any apiary.

As for the evolution of viral loads between samplings, viral load did vary with statistical significance for DWV (W test, $p=0.012$), IAPV (W test, $p=0.008$) and CBPV (W test, $p=0.012$).

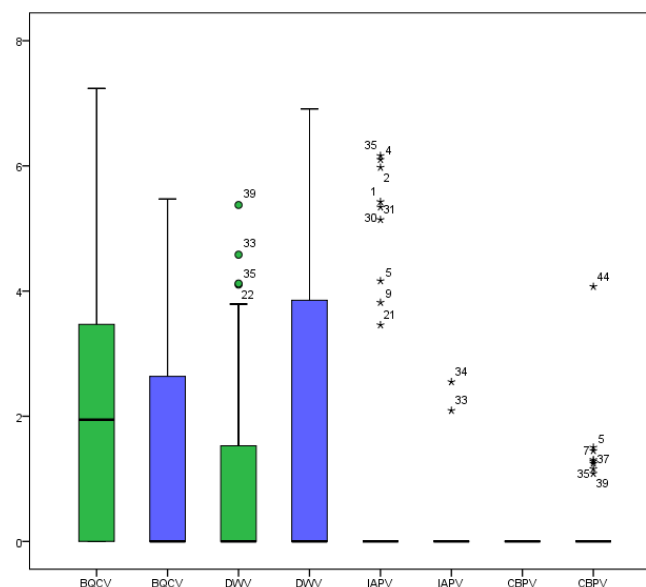


Figure 2. Viral loads of BQCV, DWV, IAPV and CBPV in logarithmic scale (GEC/bee). Green bars indicate spring-summer sampling, blue bars indicate autumn-winter sampling.

Figure 2. Viral loads of BQCV, DWV, IAPV and CBPV in logarithmic scale (GEC/bee). Green bars indicate spring-summer sampling, blue bars indicate autumn-winter sampling.

Table 2. Odds ratio and significant of variables retained in the logistic regression model.

Variable	Odds ratio (OR)	Significance (p)
Total number of colonies	0.991	0.010
Dedication	0.127	0.021
Artificial feeding spring	0.154	0.028

During the spring-summer season no correlations were identified among different viral loads (Spearman correlation, $p > 0.05$). However, correlations were observed during the autumn-winter season between the BQCV and DWV loads (Spearman correlation, $\rho = 0.396$, $p = 0.004$) and BQCV and CBPV loads (Spearman correlation, $\rho = 0.458$, $p = 0.001$). Further study of these relationships using fitting to a known curve revealed that these relationships were not robust ($R^2 < 0.3$).

BQCV, DWV, CBPV and IAPV seem to follow a random geographical distribution within Andalucía based on the results of the Chi square goodness of fit tests to a Poisson distribution ($p < 0.05$).

However, when looking at the province level, trends were appreciated. Differences of virus load distribution among provinces was observed for BQCV in spring-summer (K-W test, $p = 0.048$) and autumn-winter (K-W test, $p = 0.005$) and for DWV load in autumn-winter (K-W test, $p = 0.005$). For IAPV differences were detected in autumn-winter (K-W test, $p = 0.048$) because the only two positive apiaries were located in the same province (Jaén). For CBPV differences were observed only in autumn-winter (K-W test, $p = 0.028$). In the case of BQCV, two of the eight provinces of Andalucía (Córdoba and Málaga) in spring-summer and three provinces (Córdoba, Huelva and Jaén) in autumn-winter had a single apiary infected, when compared to the other provinces. Similarly, DWV was negative in two of the eight provinces (Córdoba and Granada). By the contrary, high loads of CBPV were distributed only among three provinces (Almería, Jaén and Málaga).

Relationships between beekeeping practices and health status

Correlations between viral load and beekeeping variables were found only in autumn-winter. Significant negative correlations were found between the total number of colonies and BQCV load (Spearman correlation, $\rho = -0.305$, $P = 0.047$) and DWV (Spearman correlation, $\rho = -0.346$, $P = 0.023$) loads. However, the fitting of the curve indicated that these associations are not very robust ($R^2 < 0.3$). Moreover a positive correlation was observed between annual percentage with crop nutrition and BQCV load (Spearman correlation, $\rho = 0.341$, $P = 0.025$), but again, fitting of the curve was not very robust ($R^2 < 0.3$).

Further exploration using Chi square and Fisher's exact tests revealed a significant relationship between BQCV presence and artificial feeding in winter in the spring-summer sampling (Fisher's exact test, $p = 0.044$) and an almost significant relationship between DWV presence and transhumance to a different province in the autumn-winter sampling (Chi square test, $p = 0.05$).

Logistic regression model in autumn-winter showed that coinfection with two or more viruses was related to the total number of colonies, the dedication of the beekeeper and the artificial feeding during the spring (Table 2).

Discussion

In this study we have evaluated the management and health status of apiaries in all the provinces of an important beekeeping region in Spain, through the collection of relevant information with questionnaires and

the evaluation of presence and load of seven bee viruses in the laboratory.

Information collected in questionnaires showed that most of the apiaries had a medium size, compared with larger operations registered in EEUU (13). Transhumance was a frequent practice, as it was observed in almost half of the beekeepers in the study. However, this transhumance is performed mostly from one natural location to another one to take advantage of the different nutritional resources, as most of the time of the year colonies were not feeding in crops. Feed supplements were also frequent, especially in spring when they are used to boost the activity and the population of the colony.

Relationships were observed between different beekeeping practices as a general trend. The total number of colonies was positively associated with the % of year in crop nutrition, and crop nutrition was positively associated with the % of colonies moved in transhumance. These trends may reflect the profile of the professional beekeepers, which have high number of colonies in bigger apiaries, move the majority of their colonies and part of these movements are performed to pollinate crops.

In general we observed that the apiaries involved in the study were healthy, as evidenced by the high scores given by the veterinaries that inspected the colonies and the lack of overt symptomatology or depopulation in most of colonies. Perception of worse health status often involved the presence of fungal disease, which has been related to potential immune depletion (23). Only one colony showed evident symptoms of viral disease in autumn-winter, possibly related with overt infection of CBPV, which was only detected during this sampling. This result is in contrast with the trend described in previous studies, where CBPV is more frequent in spring and summer (24). A slight deterioration of health status was observed from spring-summer to autumn-winter, showed by the presence of symptomatology, together with kleptoparasitism of neighboring colonies. However scores of the sampled colonies did not varied significantly when comparing both samplings.

Presence of bee viruses was frequent in the apiaries, as six of the seven viruses were detected in frequencies up to 62.5%. The most frequent viruses were BQCV and DWV in both seasons, according to previous studies in Spain (25) but clearly in contrast with another study which included samples from Andalucía and showed prevalences of bee viruses below 12% for BQCV and below 42% for DWV in spring and autumn 2006-07 (26). Significant differences between spring-summer and autumn-winter were appreciated for DWV and IAPV. CBPV was also significant but this was due to the absence of this virus in spring-summer. Whereas IAPV decreased from the first to the second sampling, DWV showed a clear increase following Varroa trends along the beekeeping season (27), although viral load was below 10^7 GEC/bee. These DWV loads, together with the absence of wing deformities as showed in the answers from the questionnaire, indicated that DWV is frequent in the colonies but mostly in covert infections. Therefore, no problems to control Varroa were detected in the majority of apiaries, suggesting that in the absence of high mite loads DWV infection could be afforded by the colonies, as previously observed (28-30). Associations between viral titres were observed for BQCV-DWV and BQCV-CBPV. However, more studies are needed to confirm these relationships, to elucidate if there is a real interaction or if viral replication is activated by other factors. Distribution of viruses was further analyzed and differences between provinces were appreciated for BQCV in both seasons and for DWV and CBPV in autumn-winter, although the most prevalent viruses, BQCV and DWV were present in all the provinces. Thus, future studies should include several consecutive years to assess if these trends are observed in subsequent beekeeping seasons, indicating that spatial factors could have an effect on distribution of bee viruses.

Finally, relationships between beekeeping practices and virus load and presence were studied. Associations were observed especially in autumn-winter, which together with Varroa and DWV seasonal trends, indicates that this season is critical in managing practices to assure an optimal health status. Total number of colonies was found to be negatively correlated with BQCV and DWV loads, suggesting that professional beekeepers with

high number of colonies tend to have less viral load in their apiaries. However, those apiaries that were located in crops were associated with higher BQCV loads, possibly indicating that these locations do not offer optimal nutrition to maintain this virus in low titres or have other factors, such as pesticides, which can have activate virus replication. Previous studies have highlighted the role of a diverse diet in the health of colonies in contrast to nutrition in monocultures (31-33). BQCV was also associated with artificial feeding in winter, which is used to keep colonies with adequate nutrition during overwintering, indicating that those apiaries which need artificial feeding possibly require special attention to their health status at the beginning of the next beekeeping season. However, no overt symptoms of BQCV have been observed in this study or reported in previous studies in Spain (25,26), so further research should deepen in these trends. Transhumance is a practice that has been related to stressing conditions in colonies (13). However in this study it has been poorly associated with DWV presence, so further studies should consider if this common practice has a real effect on colony health or, by the contrary, it really represent a benefit to colonies when used for the exploitation of natural resources. Logistic regression also revealed that artificial feeding in spring, used to boost colonies at the start of the beekeeping season and professionalism (indicated by variables total number of colonies and dedication) could be a protective factor when looking at coinfections of several viruses in the colony.

Thus, professionalism is essential for beekeeping, not only for productions or pollinating services, but also for the maintaining of the health of the colonies in an optimum status along the year, as showed for bee viruses in this study. Specific training courses in beekeeping and supervision of non-professional beekeepers could assure the presence of healthy apiaries in the future, maintaining virus infections in low levels. This could prevent for virus dissemination and appearance of overt infections that can become fatal to colonies. In this sense, optimization of Varroa treatments could be an effective way to prevent virus load increases, especially DWV, in autumn-winter, which has

been shown to be critical for the health of colonies (29).

Conclusion

This study has revealed the beekeeping practices and their association with presence and load of bee viruses in the region of Andalucía, Spain. Professionalism has been shown to be essential to maintain health in apiaries, especially in autumn-winter, when the conditions of the colonies are critical. This study has also shown trends that could serve in the design of future prospective studies to analyze the influence of beekeeping practices such as transhumance and selection of locations for apiaries.

Acknowledgements

This work has been founded by the National Beekeeping Program of the Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment (MAGRAMA) and the Ministry of Education, Culture and Sports of Spain, which supported MVR with an FPU grant.

The authors would like to acknowledge assistance from other members of the SUAT-VISAVET research group. This study would not have been possible without the collaboration of the Andalusian beekeepers and the veterinary technicians of Coordinator of Farmers Associations (COAG) of Andalucía who collected the samples and conducted the epidemiological survey. Our special thanks to Fernando Molero, Olga Morillo, Rafael Jiménez, Joaquín Becerra and Pedro de las Heras. We also acknowledge Francisco Puerta and José Manuel Fernández for their suggestions and dedication in this study. We want also to thank Belén Rivera and Rocío Sánchez for their excellent technical assistance.

References

- (1) Gallai N, Salles J, Settele J, Vaissière BE. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econ* 2009;68(3):810-821.
- (2) Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of*

- the Royal Society B: Biological Sciences 2007;274(1608):303.
- (3) vanEngelsdorp D, Meixner MD. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol* 2010;103:S80-S95.
- (4) Vanengelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, et al. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 2009 Aug 3;4(8):e6481.
- (5) Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 2007 Oct 12;318(5848):283-287.
- (6) Highfield AC, El Nagar A, Mackinder LC, Noel LM, Hall MJ, Martin SJ, et al. Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Appl Environ Microbiol* 2009 Nov;75(22):7212-7220.
- (7) Genersch E, Aubert M. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet Res* 2010 Nov-Dec;41(6):54.
- (8) Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH, Stanford MF, Zulich AW, Jabbour RE, et al. Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS One* 2010 Oct 6;5(10):e13181.
- (9) de Miranda JR, Genersch E. Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol* 2010 Jan;103 Suppl 1:S48-61.
- (10) Aubert MFA. Impact of virus infections in honey bees. In: Aubert MFA, Ball B, Fries I, Moritz R, Milani N, Bernardinelli I, editors. *Virology and the honey bee Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities*; 2007. p. 233-253.
- (11) Genersch E, Von Der OHE W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Böhler R, et al. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 2010;41(3):332-352.
- (12) Chauzat M, Carpentier P, Madec F, Bougeard S, Cougoule N, Drainudel P, et al. The role of infectious agents and parasites in the health of honey bee colonies in France. *J Apic Res* 2010;49(1):31-39.
- (13) VanEngelsdorp D, Hayes Jr J, Underwood RM, Pettis J. A survey of honey bee colony losses in the US, fall 2007 to spring 2008. *PLoS One* 2008;3(12):e4071.
- (14) MAGRAMA, Subdirección general de productos ganaderos. El sector de la miel en cifras. Principales indicadores económicos en 2010. 2011.
- (15) Kukielka D, Esperon F, Higes M, Sanchez-Vizcaino JM. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J Virol Methods* 2008 Feb;147(2):275-281.
- (16) Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, et al. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol* 2004 Dec;70(12):7185-7191.
- (17) Ribière M, Triboulot C, Mathieu L, Aurières C, Faucon JP, Pépin M. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* 2002;33(3):339-351.
- (18) Stoltz D, XueRen S, Boggis C, Sisson G. Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *Journal of Apicultural Research* (United Kingdom) 1995.
- (19) Kukielka D, Sanchez-Vizcaino JM. One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of Sacbrood honeybee and Acute bee paralysis viruses. *J Virol Methods* 2009 Nov;161(2):240-246.
- (20) Palacios G, Hui J, Quan PL, Kalkstein A, Honkavuori KS, Bussetti AV, et al. Genetic analysis of Israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States. *J Virol* 2008 Jul;82(13):6209-6217.
- (21) Gauthier L, Tentcheva D, Tournaire M, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, et al. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie* 2007;38(5):426-435.

- (22) The R foundation for statistical computing. The R project for statistical computing. 2011; , Feb 26, 2013.
- (23) Aronstein KA, Murray KD. Chalkbrood disease in honey bees. *J Invertebr Pathol* 2010 Jan;103 Suppl 1:S20-9.
- (24) de Miranda JR, Bailey L, Ball BV, Blanchard P, Budge GE, Chejanovsky N, et al. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *J Apic Res* 2013;52(4):1-56.
- (25) Kukielka D, Esperon F, Higes M, Sanchez-Vizcaino JM. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J Virol Methods* 2008 Feb;147(2):275-281.
- (26) Antunez K, Anido M, Garrido-Bailon E, Botias C, Zunino P, Martinez-Salvador A, et al. Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Res Vet Sci* 2012 Dec;93(3):1441-1445.
- (27) World Organisation for Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.2.7. Varroosis of Honey Bees. 2015; , 2015.
- (28) Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, et al. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathogens* 2012;8(6):e1002735.
- (29) Martin SJ, Ball BV, Carreck NL. Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide-treated *Varroa destructor* infested honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J Apic Res* 2010;49(1):72-79.
- (30) Francis RM, Nielsen SL, Kryger P. Varroa-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS One* 2013;8(3):e57540.
- (31) Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol Lett* 2010 Jan 20.
- (32) Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, et al. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS One* 2013 Aug 5;8(8):e72016.
- (33) Alaux C, Dantec C, Parrinello H, Le Conte Y. Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics* 2011 Oct 10;12:496.

Objetivo 4: Analizar la dinámica y las interacciones de los virus junto con otros patógenos y su implicación en el debilitamiento de las colonias



RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 4

Las pérdidas de colonias de abejas han sido objeto de numerosos estudios que han buscado las causas de este fenómeno desde diferentes puntos de vista, incluyendo factores presentes en la colmena, en el hospedador, y por la naturaleza de la práctica apícola, en el medio ambiente que rodea las colmenas. Actualmente se considera que el colapso de colonias no se debe a una única causa, sino que son varios los factores de estos tres ámbitos los implicados en estas pérdidas, tratándose de un fenómeno multifactorial (vanEngelsdorp y Meixner, 2010). En los ambientes naturales, en los que no hay cultivos y ni pesticidas, que producen estrés subletal crónico en las colonias, y en colmenares profesionales donde se asume que las prácticas de manejo son óptimas, los patógenos son una de las potenciales fuentes de problemas para la colonia. Por tanto, el objetivo 4 de esta tesis doctoral consistió en analizar la dinámica y las interacciones de virus de abejas junto con otros patógenos presentes en las colonias, así como determinar su implicación en el debilitamiento de las mismas. Para ello caracterizamos la presencia de seis virus (DWV, BQCV, ABPV, IAPV, KBV y SBV), un microsporidio (*Nosema ceranae*) y un parásito (*Varroa destructor*), en muestras de abejas adultas y cría, durante las estaciones de primavera-verano y verano-otoño, en seis colmenares profesionales situados en un entorno natural. Se observó que la presencia de patógenos fue frecuente en las colonias durante primavera-verano, pero tanto la prevalencia como la carga de los mismos aumentaron en verano-otoño junto con la presencia de sintomatología evidente y debilidad en las colonias. El análisis de componentes principales mostró que las colonias de un mismo colmenar tienen presencia y cargas de patógenos similares, y por tanto, la caracterización del entorno de las colmenas puede ser clave en el estudio de la dinámica de los patógenos en las colonias. Por otro lado, se encontró una correlación positiva entre los virus BQCV y SBV en las dos estaciones, y una correlación entre DWV y *Varroa* en verano-otoño. El debilitamiento de las colonias se relacionó con la presencia de altas cargas de DWV en verano-otoño, cuando se observó la presencia de sintomatología abierta. Además, el estudio por separado de muestras de abejas adultas y cría reveló que la cría tiene mayor carga de DWV en esta época del año, indicando que puede ser una muestra interesante en el estudio de la interacción con DWV y su implicación en el colapso de las colonias. Por último, en este estudio se describe por primera vez la presencia del virus ABPV en España.

Artículos científicos:

Vicente-Rubiano M, Kukiela D, Fernández-Carrión E, Goyache J, Sánchez-Vizcaíno JM. Dynamics and implications of pathogens in weakening of honey bee (*Apis mellifera*) colonies in natural environments. Enviado.

Dynamics and Implications of Pathogens in Weakening of Honey Bee (*Apis mellifera*) Colonies in Natural Environments.

Marina Vicente-Rubiano^{1,2*}, Deborah Kukielka³, Eduardo Fernández-Carrión^{1,2}, Joaquín Goyache^{1,2}, José Manuel Sánchez-Vizcaíno^{1,2}

1 VISAVET, Faculty of Veterinary Science, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Spain **2** Animal Health Department, Faculty of Veterinary Science, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Spain **3** Department of pharmacy and health science, Microbiology area, Pharmacy Faculty, Universidad CEU San Pablo, Madrid, Spain.

Abstract

Honeybee colonies in temperate climates are suffering noticeable losses that have been mainly observed during winter and have been attributed to a combination of factors. In absence of important sublethal stressors such as pesticides, pathogens are one of the main threats of honey bee colonies in natural environments. In the present study we have characterized in adults and brood samples the presence and dynamics of seven pathogens, six viruses, one microsporidia and one parasite, along the season. We describe the relationships between them and their implications in colony weakening in natural-environment colonies in Spain. We observed a high frequency of pathogens in spring-summer and an increase of prevalence and load in summer-autumn, together with overt symptoms and weakening. Further principal component analysis revealed that colonies of the same apiary have similarities in pathogen presence and loads and thus, characterization of the environment of the colonies could be key in the study of pathogen dynamics. A positive correlation was also found between Sacbrood bee virus (SBV) and Black queen cell virus (BQCV) along the seasons and between Deformed wing virus (DWV) and *Varroa destructor* only in summer-autumn. Weakening was related to high DWV in summer autumn, when overt symptomatology was also observed. Study of adult and brood samples separately also revealed that brood samples had higher DWV load in this season, indicating that this is an interesting sample in the study of *Varroa*-DWV dynamics and implications in colony collapse. Finally, we first report the presence Acute bee paralysis virus (ABPV) for the first time in Spain.

Funding: This study has been financed by the Research Project in honeybees *Apis mellifera* in the Autonomous Community of Madrid (CAM). M. Vicente-Rubiano holds a FPU grant from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

*mvrubiano@ucm.es

Introduction

In the last decades, an increment in the mortality ratio of colonies of western honey bee *Apis mellifera* around the world has caused important economic and environmental consequences. In North America and Europe, considered to be temperate climates, most of the losses that

have been observed occurred during winter and early spring, (1), receiving the specific name of ‘overwintering mortality’. Several biotic and abiotic causes have been claimed for colony losses, but nowadays there is a general consensus about the fact that many factors are involved (2). These factors include combination of pathogens, environment and host conditions, depicting

that this overwintering mortality has been found to be highly linked to the colony health status before winter (3).

Colonies are complex organisms highly dependent on the environment characteristics such as climate and availability/quality of food resources. These conditions determine two different seasons of high and low colony activity in temperate climates, which are spring-summer (breeding season) and autumn-winter, respectively. During the breeding season worker bees develop different age-dependent tasks, from the inside of the colony to foraging activities outside the hive. In contrast, the colony reduces its activity in autumn-winter and worker bees form a cluster inside the colony to maintain thermoregulation (4). Longevity of worker bees is adapted according to this different activity around the year, so that bees that have to overwinter are long-lived, as the colony does not have the possibility of replacing them. This longer lifespan during winter could have an energetic cost, such as down-regulation of expression of some immune routes and physiological activity (5), providing a landscape that could favor pathogen replication.

Pathogens that affect honey bees are numerous and include species of ecto- and endo parasites, bacteria, virus and fungi. One of the most challenging pathogens is the Varroa destructor mite, which causes direct damage to honeybee by feeding on its haemolymph, but it also causes indirect harm by immunosuppression (6) and by transmission and amplification of viruses. Twenty-four viruses have been already described in honey bees, although some of them are phylogenetically very close and might be variants of the same virus, such as DWV and Varroa-1 virus (7), and the ABPV-KBV-IAPV complex (8). Most of viruses normally persist in the colonies at low level of replication without showing clinical signs (covert infections). However, under stressing conditions they can enhance their replication and cause obvious symptomatology in the colonies (overt infections) (9).

Most of the known environmental stressors of honey bee colonies are present in their surroundings, and are usually common to colonies of the same apiary such as beekeeping practices and conditions of the location, such as climatology, orography, habitat fragmentation, availability of adequate quality and quantity of food resources or the use of pesticides. To this respect, natural environments avoid the presence of pesticides which are frequent in crops and have been proven to have a chronic sublethal stress in honey bee colonies and other pollinators (10,11). Natural environments are also likely to offer better resources to colonies, as they tend to have more diverse flora and it is known that diverse diet is essential for the immune system of honey bees (12). It has been also shown that honey bees have preference for natural environments (13). In addition, there are stressors that can enhance pathogen replication inside the colony; one of the most relevant is the presence of high levels of Varroa destructor, a mite that acts as viral reservoir and incubator (14). The presence of high levels of Varroa can lead to an overt outbreak of clinical symptomatology produced by viruses in the called parasitic mite syndrome (15). Nosema is also considered a stressor, especially *Nosema ceranae*, the Asian species that has almost replaced the autochthonous *Nosema apis* in Europe. Nosema has been described as one of the factors involved in worldwide colony losses together with other pathogens (16,17) although its role is controversial since studies have described that these microsporidia are common in healthy colonies (18).

Thus, colony losses are not caused by only one of these factors, but by a combination of them that lead to the rupture of the equilibrium host (honey bee)-pathogen-environment that occurs in healthy colonies. Different combinations of pathogens have been identified in dead or depopulated colonies, and several types of relationships between them have been identified. Synergies are defined as mutually or unilaterally facilitating effect between pathogens; antagonism is the opposite case, defined as mutually or unilaterally inhibitory effect (19). Accumulative effect is observed

when the effect of one pathogen is added to the effect of another pathogen, but there is no direct effect between these two pathogens. Direct effect of these combinations of pathogens in the same colony is still poorly understood and might be different depending on host physiology and apiary environment. For example, seasonality of Varroa influences the presence and load of Varroa-related viruses (20), for that reason relationships between pathogens might differ between seasons, and have different effect on honey bee health. Lately, new data on the role of the immune system in the dynamics of these relationships has also been described (21,22).

Based on these precedents, our aim is to determine whether there are differences in the health status of spring-summer and summer-winter bees maintained in natural environments and determine if differences vary between apiaries. We hypothesize that higher loads and combinations of bee pathogens in summer-autumn are related with decreased populations that can lead to colony losses in winter. Our secondary objective is to assess the implications of the differences in pathogen loads between brood and adult bees into colony health.

Material and methods

Description of apiaries

Six apiaries were sampled in the autonomous region of Madrid, central Spain. Apiaries were selected attending to their location and management. The selected apiaries belonged to six different professional beekeepers and were located in natural environments, avoiding the presence of crops and urban centers in their proximities. All the locations were distributed in different municipalities and were separated by more than 10 km, so there was no contact between apiaries. All the apiaries performed a treatment against Varroa destructor with commercial acaricides in autumn.

Description of samplings

The period of study included the season of beekeeping activity of 2014, between May

and October. First sampling was carried out between May and June 2014, when honey bees are in high collecting activity and there is abundant brood. Second sampling was carried out between August and September 2014, when most of the honey production has finished and colonies are reducing their activity to overwinter. Ten colonies were randomly selected in each apiary. More colonies were sampled (to a maximum of 13) in prevision of colony dead if symptoms lead to the beekeeper to eliminate the colony. As the same colony was considered in both samplings, they were marked during the first sampling. Colonies that could not be marked were excluded from analyses of evolution of pathogen load in each colony. From each colony, samples of adult bees (foragers) and brood were taken. Foragers were taken from the hive entrance or from the honey combs. Brood was sampled by cutting pieces of comb of approximately 5x7cm, containing capped and uncapped brood. Samples were refrigerated during transport and frozen at -80°C in the laboratory until processing.

Estimation of honey bee population and symptoms observed

To evaluate the health status of the colony, estimation of honey bee population and observation of symptomatology was described. Honey bee population was estimated at the moment of sampling by categorization of colonies following beekeepers expert opinion. Each colony was categorized as “healthy” or “weak” attending to their population condition after careful inspection of all the combs. “Healthy” colonies were those with adequate number of adult bees (nurses and foragers) and brood, whereas “weak” colonies were those with abnormally low adult bees covering combs and brood, considering the beekeeping managing and the time of the year. Presence of symptoms was also registered in each colony, including mortality, clear symptoms attributable to a known disease or general symptoms such as depopulation.

Presence and quantitation of Varroa destructor load

Varroa presence was carefully inspected in each colony in both samplings by opening a small piece of drone brood and assessing the presence of the mite. Varroa destructor was quantified in at least five colonies per apiary in October-November 2014. The method used to quantify mite load was the quantification after treatment (23). A sanitary floor with a grid to quantify Varroa was designed and adapted to the size of each colony, approximately 50 x 35 cm. Each grid was covered with non-perfumed vaseline and a net was superposed to it to avoid Varroa elimination from the hive by cleaner honey bees. Each grid was installed in the colony prior to treatment of colonies with acaricide. The grid was retired after three weeks in the colony and Varroa load was quantified in the laboratory.

Processing and molecular analysis of honey bee samples

Ten whole bees or brood (larvae and pupa) were homogenized with mortar and pestle in 2ml of PBS 1x pH 7.2, to detect pathogen infection above 25% with 0.99 of probability of detection per colony (24). Homogenates were used to extract RNA for bee viruses' analysis and DNA for microsporidia analysis. RNA was extracted with 150 µl of honey bee homogenate using RNA II Macherey-Nagel kit, following the manufacturer instructions. To extract DNA for microsporidia, the protocol of BeeBook was adapted (25). Two hundred µl of homogenate were centrifuged at 16,100g and supernatant was discarded. Pellets were frozen and crushed with sterile tips to disrupt Nosema spores. This process was repeated three times before extraction of DNA with DNA Isolation kit (Roche), following manufacturer instructions. Extracted RNA and DNA were frozen to -20°C until molecular analysis.

Molecular procedures

Six viruses and one microsporidia (namely "pathogens") were analyzed to describe both presence and quantity by amplification of pathogen-specific nucleic acid: acute bee

paralysis virus (ABPV), Israeli acute paralysis virus (IAPV), Kashmir bee virus (KBV), sacbrood bee virus (SBV), deformed wing virus (DWV), black queen cell virus (BQCV) and *N. ceranae*. One-step reverse-transcription real time polymerase chain reactions (RT-qPCR) and one-step real time polymerase chain reactions (qPCR) based on SYBR-Green dye and using primers and PCR conditions previously described by several authors (8,26-29). Pathogen loads were quantified using absolute quantification. Amplified products of bee viruses obtained by RT-PCR were cloned into a PGemT® plasmid vector (Promega) and OneShot®TOP10 chemically competent cells (Invitrogen) following the manufacturers' instructions. Plasmids were extracted from *E. coli* competent cells with the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) and confirmed as positive to each virus by PCR. Concentrations (ng/µl) of the plasmids were measured in Nanodrop®. Standard curves were constructed with triplicates of serial dilutions of known amounts of each plasmid from 10^{10} to 10^1 copies/ µl (limit of quantitation) for viruses and from 10^{10} to 10^2 copies/µl (limit of quantitation) for *N. ceranae*. Samples which dissociation curves displayed the same T_m as positive controls but whose C_t values were below the limit of quantitation were considered positive but not quantifiable (30,31). Pathogen load was expressed as genome equivalent copies per bee (GEC/bee).

Statistical analysis

Descriptive analyses of each variable were performed to ascertain distribution of data. Data was re-scaled by log10 transformation to apply statistical tests. Three unit of analysis were used in the study, from the simplest to the more complex: individual sample, colony and apiary.

Firstly, individual samples were the unit of analysis. Comparisons of pathogen load from adult bees and brood were performed using Mann-Whitney U test (M-W test) for individual samples to assess for differences of pathogen loads between these two populations. Comparisons were made both independently in each sampling and the two samplings together to study evolution of

pathogen load in adults and brood. *N. ceranae* was not included in the comparisons since it was only tested in adult bees.

Secondly, colonies were considered as the unit of analysis. Frequency of each pathogen, studied as number of positive colonies from the total analyzed colonies, was calculated for each sampling independently. Statistical differences in pathogen frequency between samplings were calculated using Fisher's exact test. As for pathogen load analysis, two different samples by group of age (adults and brood) were analyzed from each colony. Maximum pathogen load between the two samples was used as the only value per colony and pathogen. Colonies where pathogens could not be detected in both samples were considered as negative colonies for each pathogen. Evolution of the pathogen load in each colony was assessed by studying statistical differences in pathogen loads between samplings using Wilcoxon signed rank test (W test) for related samples. The value for each pathogen of individual colonies in the spring-summer sampling was compared to the value obtained in the summer-autumn sampling. For that reason, colonies where only one sampling could be performed were excluded from this analysis. In the case of apiary 3, colonies could not be identified in the second sampling, so this apiary was also excluded. Varroa analyses were not considered in this analysis as we only measured mite load in the second sampling. Relationships between pathogen loads were assessed by bivariate Pearson's correlations. Significant correlations were then studied by curve estimation regression and R^2 parameter to determine if the observed fits into a known distribution. Exploratory comparisons of pathogen loads were also made by M-W test between colonies classified as "healthy", if adult bee population and brood were considered normal by the beekeeper in each season, and "weak" if beekeepers observed low adult population and brood compared to the normal situation.

Thirdly, we performed a principal component analysis (PCA) to assess the distribution of the variance of each pathogen

load. PCA was performed using R package "prcomp".

Finally, logistic regression mixed models were used to study the influence of the studied pathogens in the weakening of colonies. Two models were run in each season by implementing R packages "lmer" and "nmle": linear regression model (LRM) and linear regression model with random effects, namely mixed effects models (MEM), considering the effect of the apiary (1 | apiary) as grouping factor to take into account the non-independence between colonies from the same apiary and allow the intercept to vary between apiaries (32). As dependent variable we used colonies classified as "healthy" and "weak" by beekeepers expert opinion. Pathogen loads were considered as independent variables and were transformed in log10 values, reclassified as Boolean variables (i. e., "0" value for colonies negative to a pathogen and "1" value for colonies positive to a pathogen) and as dummy variables. Dummy variables were constructed to classify colonies with high, medium and low load of each pathogen. Regressions were run using backward elimination process to select the variables to be retained in the final model using the Akaike's information criterion (AIC), a penalized version of the likelihood function in which the best model is indicated by the lowest value. Odds ratios (OR) with 95% of confidence interval were used to show the results of the model due to the reduced sample size.

All statistical analyses and figures were performed using SPSS v.21 and R language (33) in R Studio. Significant differences in statistical tests were considered when p value < 0.05 .

Results

Honey bee population and symptoms

Sixty four colonies were sampled in spring-summer and sixty one in the summer-autumn season. This difference in the number of colonies is due to the loss or elimination of colonies between samplings. As stated above, these losses were not included in the analyses. During the first sampling, population in colonies was

considered “healthy” by beekeepers in most of the colonies, as only 6 out of 64 (9.38%) had a bee population below adequate levels for the beekeeping managing of the apiary and the time of the year. The most frequent symptom observed was ascospaerosis (10.94%). Varroa presence was observed in 4 colonies by visual inspection (6.25%). Wing deformities were not observed in this period. During the second sampling decreased bee populations were observed in 13 out of 61 colonies (21.31%). The presence of Varroa was observed in 30 out of 61 colonies (49.18%) and wing

deformities were evident in 10 out of 61 colonies (16.39%).

Pathogen load per sample: adult vs brood sample

During the spring-summer sampling, BQCV was the most frequent pathogen in both brood and adults. This virus was also the most frequent in adults the summer-autumn sampling; however, DWV was the most frequent virus in brood in the second sampling (Table 1).

Table 1. Frequencies of acute bee paralysis virus (ABPV), Israeli acute paralysis virus (IAPV), Kashmir virus (KBV), sacbrood virus (SBV), deformed wing virus (DWV) and black queen cell virus (BQCV) found in adult and brood samples during the spring-summer and the summer-autumn samplings.

Spring-summer sampling							
	N	ABPV (%)	IAPV (%)	KBV (%)	SBV (%)	DWV (%)	BQCV (%)
Brood	59	6.78	6.78	6.78	16.95	32.20	94.92
Adults	60	1.67	1.67	3.33	10.00	50.00	76.67
Summer-autumn sampling							
	N	ABPV (%)	IAPV (%)	KBV (%)	SBV (%)	DWV (%)	BQCV (%)
Brood	46	0.00	4.35	0.00	8.70	65.22	54.35
Adults	62	1.61	16.13	0.00	9.68	48.39	80.65

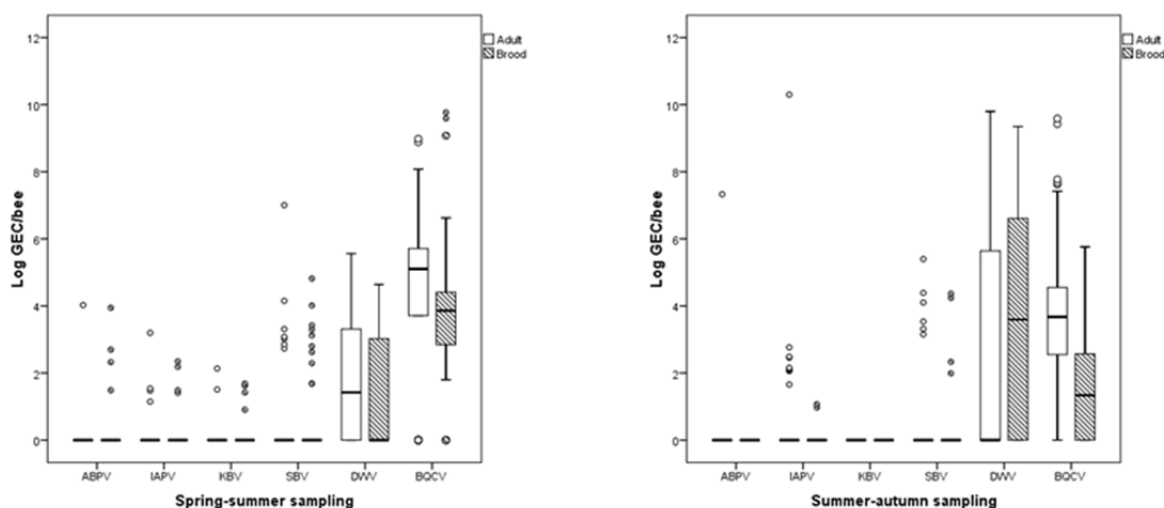


Figure 1. Pathogen load in logarithmic scale of acute bee paralysis virus (ABPV), Israeli acute paralysis virus (IAPV), Kashmir virus (KBV), sacbrood virus (SBV), deformed wing virus (DWV) and black queen cell virus (BQCV) found in adult and brood samples during the spring-summer and the summer-autumn samplings.

Remarkably, we first detected the presence of ABPV in Spain in brood and adult samples. We found highest frequencies during the spring-summer sampling, where ABPV was present in 6.78% of brood samples and 1.67% of adult samples.

As for the pathogen loads, differences between brood and adult samples were observed specially for DWV and BQCV loads (Figure 1). Focusing in these two viruses, during the spring-summer sampling adults showed higher viral loads than brood, and this difference was significant for DWV (M-W test, $p=0.019$). However, during the summer-autumn sampling this trend was only observed for BQCV (M-W test, $p<0.001$), whereas brood showed higher DWV loads. In the second sampling we also observed significant differences for IAPV (M-W test, $p=0.043$), which was higher in the adult samples.

Pathogen frequency per colony

We observed that the presence of bee pathogens was common, as we found positive colonies to all studied pathogens in spring-summer and to all of them except KBV in summer-autumn.

Spring-summer season. During the spring-summer season the presence of the seven studied pathogens was detected in the colonies. The most frequent pathogens were BQCV, which was found in almost all studied colonies (98.44%). DWV was also frequent (62.50%), followed by *N. ceranae* (33.87%), SBV (23.44%), IAPV (12.50%), KBV (9.38%) and ABPV (7.81%).

Summer-autumn. During the summer-autumn season we observed that pathogen frequencies were similar to those observed in the same sampling. ABPV (1.61%), SBV (12.90%), BQCV (88.71%) and *N. ceranae* (22.95%) decreased in number of positive colonies, whereas KBV was not detected. However, an increase in the frequency of DWV (64.52%) and IAPV (17.74%) was observed.

Frequencies of each pathogen were compared between the two samplings to analyze for the evolution of pathogen presence in the colonies. Colonies were

analyzed as independent samples (without taking into account the apiary effect) to see the general trend of colonies. No significant differences between samplings were observed in the frequency of ABPV, IAPV, SBV, DWV and *N. ceranae* (Fisher's exact test, $p>0.05$). KBV significantly decreased in the summer-autumn sampling (Fisher's exact test, $p=0.028$) but this was because it was not detected in any of the sampled colonies. A significant decrease was also observed in BQCV (Fisher's exact test, $p=0.031$), as in the first sampling was present in almost all the colonies.

Pathogen load per colony

The loads of the different pathogens in relation to the time of sampling are shown in Figure 2. For most of the pathogens, the average of viral load is under 10^1 GEC/bee for both samplings. The ABPV-KBV-IAPV complex was present in low viral loads, below 10^4 in most colonies, with outlier values with high loads, up to 10^{10} in the case of IAPV. In the second sampling, IAPV loads were higher compared to the first sampling, whereas for ABPV most of the colonies were negative and KBV could not be found in the second sampling. The pattern of SBV did not show noticeable variation loads among samplings, and only one colony had a load above 10^6 GEC/bee. However, trends could be appreciated for the DWV, BQCV and *N. ceranae* pathogens. In the case of DWV, an increase in the viral titres was clearly appreciated in the second sampling. In contrast, BQCV clearly showed a decrease of load in the summer-autumn sampling. As for *N. ceranae*, although differences in the average loads between samplings were not appreciated, a decrease of the load was observed. Wilcoxon test (excluding apiary 3) revealed significant differences between samplings for DWV and BQCV (W test, $p<0.05$). However, *N. ceranae* did not decrease significantly (W test, $p=0.841$).

Pathogen load per apiary

Although trends were statistically observed for DWV and BQCV, more in deep analysis was carried out to assess if these seasonal differences occur in all the apiaries or if, by

the contrary, there are environmental or handling conditions that could be affecting the results. In the case of DWV, an increase in the viral titres was observed in four of the five apiaries, indicating a general tendency of viral increase along the beekeeping season. However, the tendency for BQCV was not as strong as for DWV, as a clear viral decrease was observed in three apiaries, whereas in the other remaining two apiaries an increase of BQCV load was observed. Significant differences were found

in DWV load between seasons in two of the apiaries (apiaries 1 and 2, W test, $p < 0.05$), indicating that extreme values (i.e. very high or very low DWV loads) have an effect on the significance of the trend observed. For BQCV, significant differences were observed in apiaries 2 (increase of BQCV along the season) and 6 (decrease of BQCV along the season) (W test, $p < 0.05$). Thus, a general trend could not be defined for BQCV.

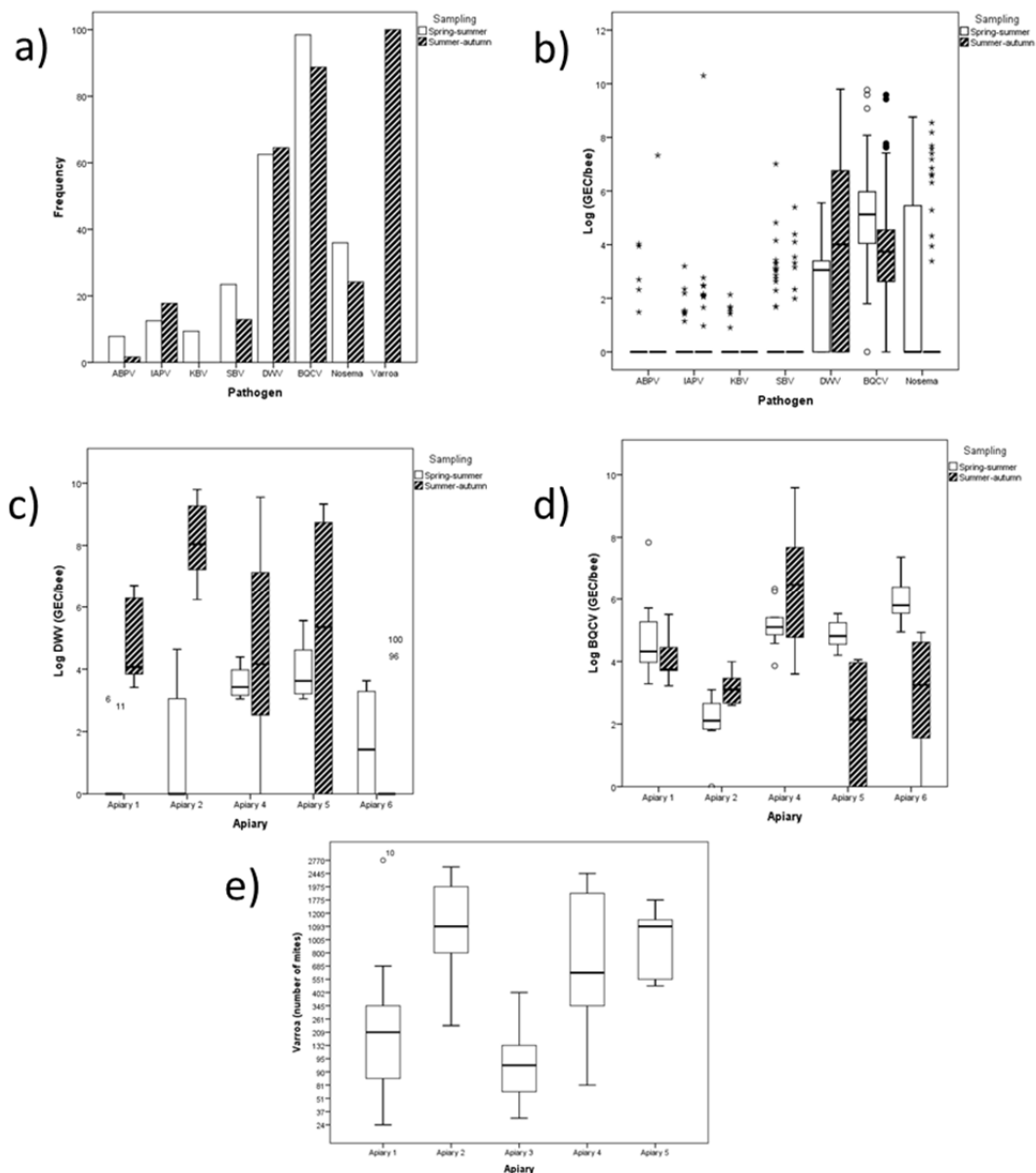


Figure 2: a) Frequencies of pathogens and Varroa found in each sampling b) Pathogen loads in logarithmic scale found in each sampling c) Deformed wing virus (DWV) load in logarithmic scale per apiary in each sampling d) Black queen cell virus (BQCV) load in logarithmic scale per apiary in each sampling e) Varroa loads per apiary after acaricide treatment. ABPV: acute bee paralysis virus; IAPV: Israeli acute paralysis virus; KBV: Kashmir virus; SBV; sacbrood virus.

Varroa infestation rates

This analysis was only performed in the summer-autumn sampling, as we used the acaricide method to quantify the infestation rate of colonies, and all colonies were treated against the mite in this time of the year. Unfortunately we were not able to include the grid to quantify Varroa into de colonies of the apiary 6, so this apiary was excluded from the analysis. Varroa was detected in all the studied apiaries, ranging between 24 and 2445 mites counted per colony. The highest mite titres were encountered in apiary 2, where the mite was also observed during the inspection of the colonies while sampling. This was also one of the two apiaries where DWV increase was significant along the study period, and the apiary where the highest loads of DWV were observed. The lowest mite titres were observed in apiary 3.

Pathogen coinfection and loads in “healthy” and “weak” colonies

We studied the presence of differences in the presence and load of the studied pathogens in “healthy” and “weak” colonies.

In the spring-summer season coinfection was frequent in both “healthy” and “weak” colonies, with 2.56 and 1.67 average pathogens per colony, respectively. However, during the summer-autumn season “weak” colonies showed significantly more number of pathogens per colony, with an average of number of pathogens of 2.68 in “weak colonies” compared to 1.82 in “healthy” colonies (Chi square, $p=0.039$).

Regarding pathogen loads, during the first sampling we observed that “weak” colonies presented higher loads of pathogens. Although this trend was clear for DWV and BQCV, this difference was not significant (M-W-test, $p>0.05$). In contrast, significant differences were found during the second sampling for BQCV (M-W-test, $p=0.014$), DWV (M-W-test, $p=0.015$) and IAPV (M-W-test, $p=0.047$). Interestingly, in both samplings we found high pathogen loads also in “healthy” colonies, above 106 in the case of DWV and BQCV.

Relationship between variables

Significant correlations between pathogens were found in both samplings. In the first sampling a positive correlation was observed at colony level, between IAPV load and *N. ceranae* load (Pearson's $R=0.19$, $p=0.028$, $n=5$) and between SBV load and BQCV load (Pearson's $R=0.605$, $p=0.017$, $n=15$). At apiary level cases of IAPV and *N. ceranae* positives occurred in apiaries 1, 3 and 4; however, no significant correlations were found in individual apiaries due to the low number of cases. Linear function had high fitting in this relationship ($R^2=0.844$). Regarding SBV and BQCV, cases were distributed along all apiaries, especially in apiary 3 where 5 cases were observed; however, correlation was not significant at apiary level (Pearson's $R=0.327$, $p=0.592$, $n=5$). Quadratic curve had the best fitting in this relationship ($R^2=0.405$).

In the second sampling the same correlation was observed between SBV load and BQCV load (Pearson's $R=0.752$, $p=0.031$, $n=8$). Fitting of the function to a curve changed to linear ($R^2=0.566$). However the correlation between IAPV load and *N. ceranae* load was not observed during this season. In contrast to the first sampling, at apiary level cases of SBV and BQCV were observed only in apiaries 1, 2, 3 and 4, although no significant correlations were found due to the low number of cases per apiary. Varroa counts were positively correlated with DWV load (Spearman's $\rho=0.668$, $p<0.001$, $n=30$). This relationship was only significant at apiary level in apiary 4, although the number of cases was low (Spearman's $\rho=1$, $p<0.001$, $n=3$).

Principal component analysis (PCA)

Three PCAs were run, one analysis per sampling (including SBV, DWV, BQCV and *N. ceranae* pathogens -in logarithmic scale-) and one extra PCA for the second sampling but adding Varroa -in logarithmic scale- (Table 2). Initially, ABPV, KBV and IAPV in the first and second samplings, and Varroa in the second sampling, were included in the analysis, but they were dismissed due to the low values of the coefficients associated to these pathogens in

the components (around zero). Only colonies where there was availability of all variables were considered in the analysis.

In the first sampling, Varroa was not considered due to the lack of data. The two first principal components (PC), PC1 and PC2, explained the 78% of the variance (PC1 60% and PC2 18%). PC1 was related to *N. ceranae* load (coefficient =0.945) and, to a lesser extent, to DWV (0.234) and BQCV (0.219) load. PC2 was mostly related to BQCV load (-0.724) and to SBV (-0.438) and DWV (-0.437) load in lesser degree. By the contrary, IAPV, KBV and ABPV load had negligible influence in the first sampling because all their values were around zero.

Similarly to the first sampling, the first PC1 and PC2 explained the 80% of the variance (PC1 58% and PC2 22%). PC1

was strongly related to DWV load (-0.836) and *N. ceranae* load (-0.490). PC2 was influenced by *N. ceranae* load (-0.856) and DWV load (-0.441). IAPV, ABPV and KBV load seemed to have a little influence in variability.

We plotted these results into biplots comparing PC1 and PC2 in each sampling (Figure 3). In the two samplings we observed two different populations of colonies showing similarities in variance. One population seems to contain those colonies in which the viruses responsible for the variance in each PC are 0 (i.e. negative). The other population contains colonies where those values for viruses are different to 0 (i.e. positive). We also observed that colonies belonging to the same apiary usually cluster together inside each of these two different populations.

Table 2. Principal component analysis (PCA) per samplings in logarithmic scale. Coefficients of the two main principal components (PC) and the proportion of the variance explained per component. Numbers in bold indicate the variable with highest cumulative proportions in each PC.

	1 st sampling		2 nd sampling	
	PC1	PC2	PC1	PC2
Standard deviation	3.377	1.870	3.888	2.419
Cumulative proportion	0.598	0.782	0.579	0.803
SBV	0.051	-0.438	-0.057	0.212
DWV	0.234	-0.437	-0.836	0.441
BQCV	0.219	-0.724	-0.123	0.162
<i>N. ceranae</i>	0.945	0.300	-0.490	-0.856

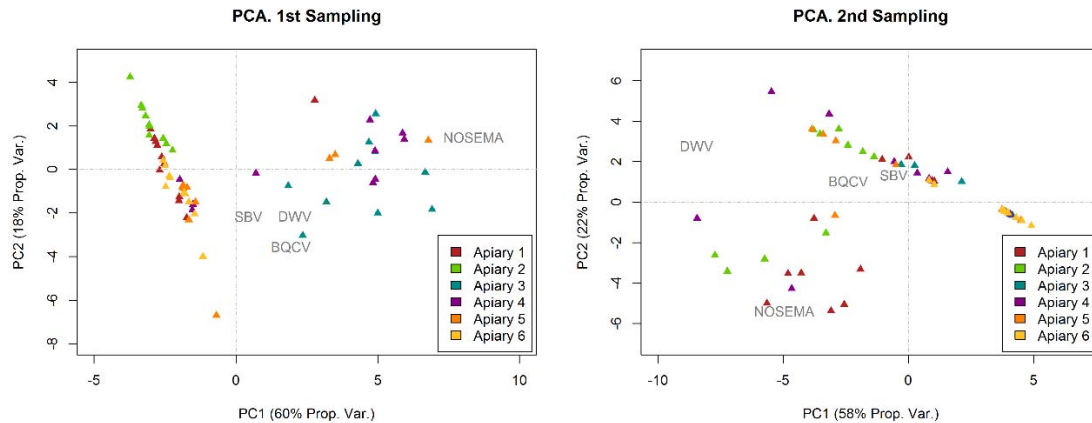


Figure 3. Results of principal component analysis (PCA) for the first and second sampling including SBV, DWV, BQCV and *N. ceranae* loads in logarithmic scale. Distribution of the two first principal components (PC) in each sampling, attending to the proportion of variance explained.

Logistic regression models.

Two LRM were run in each season to assess if pathogen presence and/or load could explain the weakness of colonies in terms of decrease of adult or brood population. During the spring-summer sampling no significant LRM models could be performed as the number of “weak” colonies was very low. For the summer-autumn sampling only BQCV load was retained in the model (OR 1.38, 95% CI [0.008-0.14], $p=0.011$). Neither interactions between variables and random effects run in the MEM did not improve the model. As these results could be influenced by colonies which had extremely high values of the pathogens (i.e. outliers), even in logarithmic scale, we considered recategorizing pathogen loads as dummy variables by classifying each colony into four categories: 0 (negative colonies), 1 (low load), 2 (medium load) and 3 (high load). When including dummy variables in the model, the only variable retained in the summer-autumn model was “high DWV load” (OR 6.17, 95% CI [1.07-48.70], $p=0.0499$). Random effects run in the MEM with dummy variables did not improve the model. No models were obtained in the spring-summer season.

Discussion

In the present study we have analyzed the relationship between the presence and quantity of eight different pathogens, six viruses, one microsporidia and Varroa mite and the weakening of colonies in six professional apiaries located in natural environments during two different seasons: the breeding season (spring-summer) and the season previous to overwintering (autumn-winter).

Comparison between adult and brood samples was also performed to assess differences in pathogen presence and load attending to the different bee populations inside a colony. Interestingly, we found that virus frequencies were higher in brood during the spring-summer season and in adults during the summer-autumn season. However, DWV followed the opposite trend reaching frequencies above 65% in brood during the summer-autumn sampling. These results contrast with a previous study which found higher frequencies of six viruses in adults in three different seasons (34). Virus loads were higher in adults in both samplings except for DWV, which had higher loads in brood during the summer-autumn sampling, according to previous research (31). High DWV presence and load in brood together with presence of wing deformities in summer-autumn may reflect the dynamics and the reproduction of Varroa inside brood cells. As brood increases for

spring to summer, the mite increases the reproduction rate until late summer when it peaks. Previous studies have established that transmission of DWV to pupae through parasitizing mites is a prerequisite for the development of deformed wings (overt symptomatology) (35-38), but the key factor for the development of wing deformities is the replication of DWV inside the mite resulting in a virus titer above a certain threshold that is injected into pupae (14,38). Taken together, these results suggest that the study of brood is determinant to understand DWV dynamics in the colony.

At colony level, a deterioration of the bee population was observed across the period of study. In the spring-summer season colonies had strong bee populations and scarce disease symptoms. In contrast to this situation, decreased populations were detected in higher frequencies during the summer-autumn season, with frequent symptoms of varroosis and wing deformity. Objective comparisons of bee populations could not be performed as apiaries were selected to represent the situation of commercial colonies in natural environments and minimum external manipulation was desired. Thus, as colonies were not standardized at the beginning of the study, expert opinion of professional beekeepers was selected as method to detect colonies where bee population was anomalously low for each different managing and environmental conditions.

Most of the analyzed pathogens, six viruses and one microsporidia, have been found to be frequent in these colonies. Interestingly, we found the presence of ABPV in 7.81% and 1.61 % of colonies in spring-summer and summer-autumn seasons, respectively. To our knowledge, this is the first time that this virus is detected in Spain despite previous studies that monitored it (39) including national surveys (40). The presence of this virus in Spain is not surprising, since it had been described in close locations such as Portugal and France (41). The low number of positive colonies did not allow us to describe ABPV seasonality, which peaked in early summer in the present study, in controversy with previous research which described higher

frequencies in late summer in France (31,34). More studies should be conducted to determine if ABPV is present at very low levels covert infections in Spanish colonies. Comparing frequencies of viruses, ABPV and KBV seem to be the least frequent pathogens, followed by IAPV and SBV and *N. ceranae*. The two most frequent pathogens were BQCV and DWV which were found in at least 88.71% and 62.50% of colonies, respectively, according with a previous study in Spain (42) which also described a broad distribution of BQCV and DWV, and with other studies in Europe (31,34,43). However our results are clearly in contrast with a recent study also conducted in Spain which described prevalences below 30% for five viral pathogens (44). We also found that the presence of several pathogens coinfecting the same colony is common in the two studied seasons. However is during the summer-autumn season when “weak” colonies had significantly more number of pathogens coinfecting the same colony. These results are in accordance with previous observations of frequent coinfections in weak colonies related with winter mortality (45,46), although those observations were not quantitative. These results also suggest that the presence of bee viruses and microsporidia is frequent in this area, according with other studies in healthy and diseased colonies in different European regions (3,34,43,47) and in Spain (27,42,48). Noticeably, higher viral loads were found for BQCV and DWV in the order of 109 GEC/bee in both samplings. As for seasonal variations between the two samplings, an increase of frequencies of positive colonies was only observed for DWV and IAPV. These two viruses are transmitted by the parasitic mite *Varroa*, which was found in all sampled colonies in the summer-autumn season when a peak if the mite is usually observed (49). Viral loads of DWV and IAPV also increased along the sampling period. This trend was clear for DWV, as a significant increase in viral load was observed when considering all the colonies, and when analysis by colony, the increase was observed in four of the five although it was only statistically significant in two apiaries. In contrast, we observed a decrease of BQCV and *N. ceranae* loads. In

the case of BQCV a significant change of load between samplings was found; however, when analyzing each apiary independently this was not a clear trend. These results agree with previous research on seasonal variation of DWV presence and load (21,31,34,50,51) and are also similar to those observed in previous studies in Europe for ABPV-IAPV-KBV complex and DWV (52) and for DWV, BQCV and *N. ceranae* seasonal variations (51).

Moreover, Varroa was present in the 100% of colonies in the summer-autumn season, indicating the mite could be an important factor in the presence and replication of the rest of pathogens, due to its immunosuppressor effect (6). Indeed, evidence of varroosis could be detected in half of the colonies. Mite load was highly variable depending on the colony and the apiary, from the order of 101 to 103 mites per colony. This high variability could be explained by the method of quantification, as Varroa treatments have different levels of efficacy. However, as all the treatments used during the period of study are commercial and their efficacy ranges from 82-99% (53), we believe that if present, the bias in Varroa counts is minimum.

When comparing “healthy” and “weak” colonies in our study we observed that higher pathogen loads occur in colonies with low bee population especially during the second sampling for BQCV, SBV and, to a lesser extent, DWV. Other studies have highlighted the role of viruses as indicators or predictors for winter losses, especially DWV load per se (46,51,54) or in combination with Varroa and other Varroa-transmitted viruses (52). Our results also suggest that actions during the summer-autumn season to identify changes in pathogen loads of colonies could be helpful to anticipate health events in the overwintering of colonies located in natural environments. However, as several pathogens are present in the same colony, interactions between them could be having an effect in the colony. For that reason, exploratory correlation analyses were performed between pathogen loads in each sampling. Strong correlations were only found for BQCV and SBV loads as a general

trend in the six apiaries of study. We could not significantly allocate this trend to any of the studied apiaries, by the contrary this was a general trend including all the studied colonies. However, as fitting of the curve had a medium value, more studies are required to confirm this trend. Predictably, correlation between Varroa and DWV was also found as a general trend when considering all studied colonies during the second sampling. Numerous studies have revealed the relationship between the mite and this virus and the characteristics of this interaction (36,51,55,56). Especially, recent studies have categorized this interaction as a synergy mediated by host immunity (21). The presence of overt symptomatology of varroosis and wing deformities, together with the positive correlation between these two pathogens, suggest that our results are in line with this recent publication. However, more in deep analysis including measurement of NF- κ B immune route should be performed to confirm this in future studies. Relationship between DWV and *N. ceranae* has been described as competitive (57) and more recently, as synergistic (58). However in the present study no relationship was observed between these two pathogens, according to the study of Martin et al., 2013 (59).

To further investigate if these trends are influenced by their environment, we ran a principal component analysis (PCA). PCA is a multivariate analysis that identifies the greatest sources of variation (principal components) in datasets combining multiple variables, without making any prior assumptions about the origin of the samples (60). This methodology allowed us to look about trends in the complete data set in each sampling. We observed that pathogen loads follow two different clusters, distinguishable from each other, in both samplings when considering the first two PC. The first cluster includes colonies in which the variables that explain the PC are 0 (negative colonies) and the second cluster includes colonies where the value of same variables (i.e. pathogen load) is different from 0 (positive colonies). Interestingly, considering these two clusters, we observed that colonies belonging to the same apiary have a similar behavior if compared to

colonies of the rest of apiaries. This result suggests transmission of pathogen between colonies from the same apiary and that apiary conditions such as environment factors and beekeeping practices have an effect on variability of pathogen loads between apiaries. A recent study has also highlighted a link between colony disorders and the environment of the apiaries, and specifically, the presence of agricultural crop areas (32). Thus, more in deep studies should characterize the apiary effect in natural environments and determine which factors have an influence in honey bee colonies.

Finally, we ran two logistic regression models (LRM) and mixed effects models (MEM), one per each season, to assess if pathogen presence and load could be determining the decrease of bee population in colonies. A significant model was only found during summer-autumn considering only BQCV load. However, as this virus seems to be present in high prevalences and viral loads in asymptomatic colonies (31), pathogen loads were transformed into categories in dummy variables to avoid the effect of outliers. With this methodology, the only variable retained in the summer-autumn model was “high DWV load”. Despite the correlation of DWV load with Varroa load during the summer-autumn season the model did not include Varroa, as the number of colonies where the mite was measured was lower. Moreover, we could not prove a direct effect of SBV-BQCV interaction on colony weakening as it was not included in the model, but a recent study has reported an increase of these two viruses in colonies untreated for Varroa that collapsed in winter (61). Thus, future studies should deepen in this relationship to assess its effect on colony health.

Conclusion

In this study we show the differences in health status of colonies located in natural environment at two different time-points: the breeding season (spring-summer sampling) and the season previous to overwintering (summer-autumn sampling). Here we report for the first time the presence of ABPV in brood and adult samples in

Spain. We also show that although the presence of bee pathogens such as viruses and microsporidia is frequent in colonies in both samplings, during the summer-autumn season disease symptoms and weakening of colonies increased. We detected a relationship between “weak” colonies and high DWV loads and between DWV load and Varroa load. Although the data suggest an effect of the interaction Varroa-DWV in the weakening of colonies, more studies are required to confirm this tr and the interaction with other pathogens in colonies located in natural environments. Our data also suggest that brood is a key sample to study DWV dynamics in the colony. Finally, we observed that the environment of colonies could play an important role in the distribution of pathogen loads, and thus, it could have an effect on the appearance of disease symptoms in the colonies.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge to the beekeepers participating in this study and the Beekeeping association of the Community of Madrid (APISCAM, Spain) for their collaboration and support and Rocío Sánchez for her excellent technical support.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: MVR, DK, JG, JMSV. Performed the experiments: MVR. Analyzed the data: MVR, DK, EFC. Wrote the paper: MVR, DK, EFC, JG, JMSV.

References

- (1) vanEngelsdorp D, Meixner MD. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol* 2010;103:S80-S95.
- (2) Neumann P, Carreck NL. Honey bee colony losses. *J Apic Res* 2010;49(1):1-6.
- (3) Genersch E, Von Der OHE W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, et al. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter

- losses of honey bee colonies. *Apidologie* 2010;41(3):332-352.
- (4) Stabentheiner A, Pressl H, Papst T, Hrassnigg N, Crailsheim K. Endothermic heat production in honeybee winter clusters. *J Exp Biol* 2003 Jan;206(Pt 2):353-358.
- (5) Steinmann N, Corona M, Neumann P, Dainat B. Overwintering Is Associated with Reduced Expression of Immune Genes and Higher Susceptibility to Virus Infection in Honey Bees. *PLoS One* 2015 Jun 29;10(6):e0129956.
- (6) Yang X, Cox-Foster DL. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 May 24;102(21):7470-7475.
- (7) de Miranda JR, Genersch E. Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol* 2010 Jan;103 Suppl 1:S48-61.
- (8) de Miranda JR, Cordoni G, Budge G. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol* 2010 Jan;103 Suppl 1:S30-47.
- (9) Hails RS, Ball BV, Genersch E. Infection strategies of insect viruses. 2008.
- (10) Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 2007;52:81-106.
- (11) Bryden J, Gill RJ, Mitton RA, Raine NE, Jansen VA. Chronic sublethal stress causes bee colony failure. *Ecol Lett* 2013 Dec;16(12):1463-1469.
- (12) Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol Lett* 2010 Jan 20.
- (13) Couvillon MJ, Schurch R, Ratnieks FL. Dancing bees communicate a foraging preference for rural lands in high-level agri-environment schemes. *Curr Biol* 2014 Jun 2;24(11):1212-1215.
- (14) Gisder S, Aumeier P, Genersch E. Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol* 2009 Feb;90(Pt 2):463-467.
- (15) Hung AC, Shimanuki H, Knox DA. The role of viruses in bee parasitic mite syndrome. *Am Bee J* 1996.
- (16) Higes M, Martin-Hernandez R, Botias C, Bailon EG, Gonzalez-Porto AV, Barrios L, et al. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* 2008 Oct;10(10):2659-2669.
- (17) Higes M, Martin-Hernandez R, Garrido-Bailon E, Gonzalez-Porto AV, Garcia-Palencia P, Meana A, et al. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ Microbiol Rep* 2009 Apr;1(2):110-113.
- (18) Fernandez JM, Puerta F, Cousinou M, Dios-Palomares R, Campano F, Redondo L. Asymptomatic presence of *Nosema* spp. in Spanish commercial apiaries. *J Invertebr Pathol* 2012 Oct;111(2):106-110.
- (19) Retschnig G, Williams GR, Mehmman MM, Yanez O, de Miranda JR, Neumann P. Sex-specific differences in pathogen susceptibility in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* 2014 Jan 17;9(1):e85261.
- (20) Francis RM, Nielsen SL, Kryger P. Varroa-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS One* 2013;8(3):e57540.
- (21) Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, et al. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathogens* 2012;8(6):e1002735.
- (22) Kuster RD, Boncristiani HF, Rueppell O. Immunogene and viral transcript dynamics during parasitic *Varroa destructor* mite infection of developing honey bee (*Apis mellifera*) pupae. *J Exp Biol* 2014 May 15;217(Pt 10):1710-1718.
- (23) Dietemann V, Nazzi F, Martin SJ, Anderson DL, Locke B, Delaplane KS, et al. Standard methods for varroa research. *J Apic Res* 2013;52(1):1-54.

- (24) Pirk CW, De Miranda JR, Kramer M, Murray TE, Nazzi F, Shutler D, et al. Statistical guidelines for *Apis mellifera* research. *J Apic Res* 2013;52(4):1-24.
- (25) Fries I, Chauzat M, Chen Y, Doublet V, Genersch E, Gisder S, et al. Standard methods for *Nosema* research. *J Apic Res* 2013;52(1):1-28.
- (26) Kukiélka D, Esperon F, Higes M, Sanchez-Vizcaino JM. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J Virol Methods* 2008 Feb;147(2):275-281.
- (27) Kukiélka D, Sanchez-Vizcaino JM. One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of Sacbrood honeybee and Acute bee paralysis viruses. *J Virol Methods* 2009 Nov;161(2):240-246.
- (28) Stoltz D, XueRen S, Boggis C, Sisson G. Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *Journal of Apicultural Research* (United Kingdom) 1995.
- (29) Forsgren E, Fries I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet Parasitol* 2010 Jun 24;170(3-4):212-217.
- (30) Ribière M, Triboulot C, Mathieu L, Aurières C, Faucon JP, Pépin M. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* 2002;33(3):339-351.
- (31) Gauthier L, Tentcheva D, Tournaire M, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, et al. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie* 2007;38(5):426-435.
- (32) Simon-Delso N, San Martin G, Bruneau E, Minsart L, Mouret C, Hautier L. Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. 2014.
- (33) The R foundation for statistical computing. The R project for statistical computing. 2011; , Feb 26, 2013.
- (34) Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, et al. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol* 2004 Dec;70(12):7185-7191.
- (35) Ball BV, Allen MF. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann Appl Biol* 1988;113(2):237-244.
- (36) Bowen-Walker P, Martin S, Gunn A. The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera*L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni*Oud. *J Invertebr Pathol* 1999;73(1):101-106.
- (37) Shen M, Cui L, Ostiguy N, Cox-Foster D. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J Gen Virol* 2005 Aug;86(Pt 8):2281-2289.
- (38) Yue C, Genersch E. RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol* 2005 Dec;86(Pt 12):3419-3424.
- (39) Kukiélka D, Perez AM, Higes M, del Carmen Bulboa M, Sánchez-Vizcaino JM. Analytical sensitivity and specificity of a RT-PCR for the diagnosis and characterization of the spatial distribution of three *Apis mellifera* viral diseases in Spain. *Apidologie* 2008;39(6):607-617.
- (40) RASVE M. Programa de vigilancia piloto sobre las pérdidas de colonias de abejas 2014-15. 2015; , 2015.
- (41) de Miranda JR, Cordoni G, Budge G. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol* 2010 Jan;103 Suppl 1:S30-47.
- (42) Kukiélka D, Esperon F, Higes M, Sanchez-Vizcaino JM. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J Virol Methods* 2008 Feb;147(2):275-281.
- (43) Berenyi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Koglbberger H, Nowotny N. Occurrence of

- six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl Environ Microbiol* 2006 Apr;72(4):2414-2420.
- (44) Antunez K, Anido M, Garrido-Bailon E, Botias C, Zunino P, Martinez-Salvador A, et al. Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Res Vet Sci* 2012 Dec;93(3):1441-1445.
- (45) Ravoet J, Maharramov J, Meeus I, De Smet L, Wenseleers T, Smagghe G, et al. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS One* 2013 Aug 26;8(8):e72443.
- (46) Budge GE, Pietravalle S, Brown M, Laurenson L, Jones B, Tomkies V, et al. Pathogens as Predictors of Honey Bee Colony Strength in England and Wales. *PLoS One* 2015 Jul 17;10(7):e0133228.
- (47) Bacandritsos N, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinioti E, Caldon M, et al. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *J Invertebr Pathol* 2010 Nov;105(3):335-340.
- (48) Kukiela D, Perez AM, Higes M, del Carmen Bulboa M, Sánchez-Vizcaíno JM. Analytical sensitivity and specificity of a RT-PCR for the diagnosis and characterization of the spatial distribution of three *Apis mellifera* viral diseases in Spain. *Apidologie* 2008;39(6):607-617.
- (49) World Organisation for Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.2.7. Varroosis of Honey Bees. 2015; , 2015.
- (50) Martin SJ, Ball BV, Carreck NL. Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide-treated *Varroa destructor* infested honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J Apic Res* 2010;49(1):72-79.
- (51) Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P. Dead or alive: Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl Environ Microbiol* 2012;78(4):981-987.
- (52) Francis RM, Nielsen SL, Kryger P. *Varroa*-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS One* 2013;8(3):e57540.
- (53) New Zealand Ministry of Primary Industries. A Review of Treatment Options for Control of *Varroa* Mite in New Zealand. 2008; , 2015.
- (54) Highfield AC, El Nagar A, Mackinder LC, Noel LM, Hall MJ, Martin SJ, et al. Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Appl Environ Microbiol* 2009 Nov;75(22):7212-7220.
- (55) Martin SJ. The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *J Appl Ecol* 2001;38(5):1082-1093.
- (56) Sumpter DJ, Martin SJ. The dynamics of virus epidemics in *Varroa*-infested honey bee colonies. *J Anim Ecol* 2004;73(1):51-63.
- (57) Doublet V, Natsopoulou ME, Zschiesche L, Paxton RJ. Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *J Invertebr Pathol* 2015 Jan;124:31-34.
- (58) Zheng HQ, Gong HR, Huang SK, Sohr A, Hu FL, Chen YP. Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus. *Vet Microbiol* 2015 May 15;177(1-2):1-6.
- (59) Martin SJ, Hardy J, Villalobos E, Martin-Hernandez R, Nikaido S, Higes M. Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically? *Environ Microbiol Rep* 2013 Aug;5(4):506-510.
- (60) Mondet F, de Miranda JR, Kretzschmar A, Le Conte Y, Mercer AR. On the front line: quantitative virus dynamics in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies along a new expansion front of the parasite *Varroa destructor*. *PLoS pathogens* 2014;10(8):e1004323.

(61) Locke B, Forsgren E, de Miranda JR. Increased tolerance and resistance to virus infections: a possible factor in the survival of Varroa destructor-resistant honey bees (*Apis mellifera*). PLoS One 2014 Jun 13;9(6):e99998.

DISCUSIÓN



Los fenómenos de pérdida repentina de colmenas se han venido observando desde la antigüedad, con episodios registrados desde el año 950 (de Miranda et al. 2010b), y han tenido diferente repercusión dependiendo de la magnitud de las pérdidas. Sin embargo, la mayoría de estos fenómenos presentaron un carácter puntual y encontraron una causa subyacente. Un ejemplo es el caso de la Isla de Wight, en la costa sur de Inglaterra, donde la mortalidad de colmenas se debió probablemente a un cúmulo de factores, incluyendo la presencia de CBPV, el exceso de colmenas en el mismo emplazamiento y la presencia de climatología adversa que impidió el pecoreo de las abejas (Neumann and Carreck, 2010). En cambio, las pérdidas observadas en las últimas décadas han tenido una distribución prácticamente mundial, con casos registrados en numerosas localizaciones especialmente en el hemisferio norte. Tanto en el SDC como en las “pérdidas invernales” la manifestación final que se observa es el debilitamiento de la colonia en términos de reducción de población y la mortalidad de la misma. Además, no se ha encontrado un único factor que explique estos fenómenos, sino que se sospecha de la interacción entre varios factores, tanto bióticos como abióticos.

A pesar de su probable carácter multifactorial, los patógenos sin duda juegan un papel fundamental en estas pérdidas. Entre ellos destacan los virus debido a su amplia prevalencia y distribución, a su frecuente presentación como coinfecciones dentro de la misma colonia, a su presencia como infecciones encubiertas, que en situaciones de estrés pueden pasar a infecciones aparentes, a su interacción con otros patógenos, especialmente Varroa, y al escaso conocimiento de la naturaleza de estas relaciones, no solo entre virus y hospedador si no entre estos virus, otros patógenos, el hospedador y el medio ambiente. Como ya se ha demostrado a lo largo de este documento, la complicada interacción entre estos factores es uno de los mayores interrogantes aun sin contestar en el problema de la pérdida de las abejas. Así, para poder esclarecerlo, es preciso descifrar primero cuál es el impacto de cada uno de esos factores sobre el estatus sanitario de las abejas. En esta tesis, se ha decidido trabajar desde una perspectiva poco desarrollada hasta ahora, y que puede aportar una información muy valiosa a este área de conocimiento. Dicho abordaje presenta a los virus como patógenos con gran influencia sobre el estado sanitario de las abejas y pretende describir su implicación y relación con el hospedador, con Varroa-como representante de otros tipos de patógenos-y con el medio ambiente, como escenario donde se enmarcan todos los sucesos anteriores. Como parte importante del problema de la pérdida de colmenas, y ante la imposibilidad de eliminarlos, la estrategia de actuación frente a los virus debe basarse en conocer qué efecto producen en las colmenas en diferentes

circunstancias con el objetivo de minimizar su impacto y tomar decisiones orientadas a prevenir futuras pérdidas de colonias.

Así, la metodología empleada en el desarrollo de esta tesis presenta una doble aproximación que abarca el diagnóstico y la epidemiología de los principales virus que afectan a *Apis mellifera* teniendo en cuenta que las abejas desarrollan su actividad en un contexto biótico y medioambiental cambiante.

Siguiendo esta línea, en primer lugar, se ha estudiado la implicación del virus IAPV, descrito como un indicador del SDC en EEUU (Cox-Foster et al. 2007) en la pérdida de colmenas en España, y se ha explorado la presencia de potenciales virus desconocidos en una colonia con SDC en España mediante la técnica de última generación “metagenómica”. Además, se ha determinado la implicación de las prácticas de manejo apícola como potenciales factores de riesgo asociados a una mayor presencia vírica en las colmenas y se ha explorado la dinámica y las relaciones de patógenos y su implicación en el debilitamiento de colonias en España.

1. Diagnóstico de virus como potenciales causantes de la pérdida de colonias

Son muchos los estudios que han destacado el papel de diferentes factores como potenciales causantes de la pérdida de colonias. Así, hay estudios que han atribuido estas pérdidas a ciertos virus, sobre todo a los que forman parte del complejo ABPV-IAPV-KBV (Berenyi et al. 2006; Cox-Foster et al. 2007) o al combo DWV-Varroa (Highfield et al. 2009; Martin et al. 2012). Entre ellos, destaca el virus IAPV ya que se describió poco después de observarse las primeras pérdidas de colonias.

A pesar de ser descubierto recientemente en colonias colapsadas de Israel donde se observó una elevada virulencia (Maori et al. 2007b), no fue hasta la publicación de un estudio sobre el SDC en EEUU cuando este virus cobró mayor importancia. En el estudio de Cox-Foster et al., se realizó un estudio metagenómico de la flora bacteriana y los virus de abeja presentes en colonias con SDC y se comparó con colonias sanas. Dos dicistrovirus, KBV e IAPV, se encontraron en las colonias con SDC, pero a diferencia de KBV, IAPV se encontró exclusivamente en estas colmenas colapsadas, incrementando el riesgo de SDC (odds ratio=65, $p<0.0001$). En este mismo artículo también se discutió

sobre el origen de IAPV en EEUU, determinando que la fuente se situó potencialmente en Australia mediante la comparación de secuencias del virus en un análisis filogenético.

En España, la presencia de IAPV fue descrita en 2010 en una única muestra en Valencia (Kukielka and Sánchez-Vizcaíno, 2010) y se ha estudiado su prevalencia en varios estudios (Garrido-Bailón et al. 2010; Antunez et al. 2012). Sin embargo, a pesar de la aparente implicación que IAPV parece tener en la pérdida de colmenas, no se ha realizado ningún estudio cuantitativo en el que se evalúe el efecto de la presencia y la carga de este virus sobre la pérdida de colmenas, ni se ha investigado el origen de IAPV en España. El objetivo 1 de esta tesis doctoral pretende dar respuesta a estos interrogantes.

Durante este estudio se analizaron muestras procedentes de la CCAA de Andalucía, ya que es una de las regiones más importantes a nivel de producción apícola (MAGRAMA, 2015). El análisis molecular reveló la presencia de IAPV en el 13,5% de las colonias analizadas que fue similar a la descrita en estudios previos (Garrido-Bailón et al. 2010; Antunez et al. 2012), sin presentar ningún síntoma de SDC ni mortalidad. La carga vírica fue del orden de 10^5 CEG/abeja de media, pero llegando hasta un máximo de 10^7 CEG/abeja. Estas cargas víricas en colmenas aparentemente sanas están en concordancia con las cargas encontradas en otros estudios previos en Francia (Gauthier et al. 2007) y Hawái (Martin et al. 2012).

Por otro lado, no se pudo relacionar estadísticamente la presencia de IAPV con el SDC o la debilidad de la colonia o con ninguno de los síntomas observados en el momento del muestreo. Además, la presencia de cargas virales del orden de 10^7 tanto en colmenas sanas como débiles indica que estas cargas víricas no causan infección aparente por sí solas, por lo que la implicación de cargas víricas más altas o la presencia de factores de estrés que desencadenen la replicación vírica pueden ser requisitos para que la colonia se vea afectada. Por tanto, al contrario que el estudio realizado en EEUU, en este estudio se ha encontrado IAPV en colonias sanas, con cargas víricas del orden de 10^7 que aparentemente no causan sintomatología evidente en la colonia, lo cual sugiere que la presencia de IAPV no es un indicador por sí solo de SDC en España. A pesar de no explicar por sí solo el SDC, la alta capacidad patógena de este virus ha sido demostrada, así como su relación con Varroa y el sistema inmune de la abeja, por ello no se descarta como causa de pérdida de colmenas cuando aparece en combinación con otros factores. Así, mediante estudios *in vivo* se ha sugerido que IAPV tiene efecto en la homeostasis de la abeja al interferir en la transcripción de genes que regulan las funciones básicas celulares (Boncristiani et al. 2013).

Por otro lado, además de transmitirse horizontalmente mediante la alimentación de larvas y comportamientos como la trofalaxis, IAPV es capaz de transmitirse a través de Varroa (Di Prisco et al. 2011). Los últimos estudios han puesto de manifiesto que IAPV produce una infección sistémica en abejas de todas las edades y sexos, con mayor presencia en la cría y que está relacionado con la debilidad de las colonias (Chen et al. 2014). Este último trabajo también señala un efecto directo de IAPV sobre el metabolismo y el sistema inmune de la abeja, demostrado por un aumento en la expresión de genes de distintas rutas y por el descubrimiento de una ruta de supresión del ARN de interferencia (iRNA), mecanismo de defensa principal de los insectos frente a infecciones virales (Chen et al. 2014).

En el objetivo 1 además se han descrito variantes de IAPV encontradas en colmenas sanas que están filogenéticamente próximas a variantes de IAPV relacionadas con la mortalidad de gran número de colmenas. Este hecho sugiere que IAPV se encuentra en infecciones encubiertas y que el desarrollo de síntomas puede estar ligado a la presencia de otros factores que favorecen la replicación vírica, como la presencia de Varroa y otros factores que pueden someter a la colmena a un estado de estrés, de manera similar a virus como DWV (Chen et al. 2014). Por tanto, puesto que la presencia de IAPV en España no es un hecho esporádico y factores como Varroa están presentes en todas las colonias, es necesario considerar la interacción de este virus con otros factores presentes en las colmenas de España en los siguientes estudios relativos a la pérdida de colmenas.

Por otro lado, a pesar de que los virus rápidamente se han perfilado como uno de los factores implicados en las causas de la pérdida de colonias, ninguno de los virus conocidos hasta ahora ha sido capaz de explicar por sí solo la este fenómeno, así como tampoco lo ha conseguido el estudio aislado del impacto de otros patógenos y demás factores de riesgo sobre la abeja. Por ello, los numerosos estudios que han seguido a la descripción de IAPV como factor de riesgo del SDC (Cox-Foster et al. 2007) lo han descartado como único factor causante, al encontrarse de igual manera en colmenas sanas y enfermas. Además, la alta ocurrencia de coinfecciones tanto a nivel de la colonia como de abejas individuales han dirigido las nuevas hipótesis de investigación hacia un abordaje multifactorial donde se contemplan varios patógenos en el estudio de las causas tanto de enfermedades conocidas como de las enfermedades infecciosas emergentes de origen desconocido. Estas nuevas hipótesis requieren el empleo de nuevas metodologías diagnósticas. Las técnicas de PCR y RT-PCR que han sido tan ampliamente empleadas en el estudio reciente de los patógenos de las abejas requieren del conocimiento previo de la

secuencia de los mismos para su diseño, impidiendo así detectar la presencia de patógenos desconocidos potencialmente implicados en la pérdida de colmenas y por tanto, sesgando las conclusiones. Esta limitación ha sido sin embargo solucionada con el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva y la metagenómica, que permite la detección simultánea y la caracterización de diferentes patógenos, incluyendo virus, bacterias, parásitos, y hongos.

Haciendo uso de esta novedosa técnica no sesgada, en esta tesis se ha identificado la presencia de tres virus, ALPV, IAPV y LSV, en una muestra con SDC en España (Navarra). ALPV es un virus que infecta a diferentes especies de ápidos (orden Hymenoptera), aunque también ha sido descrito en los órdenes Coleoptera y Hemiptera (Liu et al. 2014). Sin embargo, en 2011 fue descrito por primera vez en asociación con las abejas en EEUU, denominando a esta variante como “Brookings” (Runckel et al. 2011). La detección de ALPV en muestras de colonias de múltiples localizaciones geográficas en el curso de varios meses llevó a concluir que este virus no se transmite pasivamente a las abejas al pecorear en las mismas flores que otros ápidos. Sin embargo, este estudio no pudo asociar la infección con la variante Brookings a ninguna sintomatología en las colonias y concluyó que se necesitan más estudios para determinar si el virus ALPV es comensal, es transportado por las abejas, o realmente tiene un efecto patógeno sobre las mismas. Partiendo de esa base, en este estudio se describe por primera vez la presencia de una variante ALPV-like en Europa. Aunque se desconoce el efecto patógeno de ALPV en abejas (Van Munster et al. 2002b), la similitud entre la variante detectada en España y la variante Brookings hace pensar que ambos virus afectan a su hospedador de forma similar. Además, dada la frecuencia con la que se detectó la variante Brookings en EEUU y el descubrimiento de una variante capaz de infectar abejas en Europa, son necesarios más estudios que demuestren el efecto patógeno de ALPV en las abejas. Un primer paso es el estudio de la prevalencia de ALPV en abejas y en otros polinizadores, para determinar su distribución y su rango de hospedadores, así como su transmisión.

En cuanto a IAPV, y tras lo descrito en el objetivo 1 de esta tesis para las muestras de Andalucía, el estudio metagenómico y análisis filogenético de la variante de IAPV detectada mostró igualmente similitud con variantes de Francia. Por tanto, la variante de IAPV encontrada en este estudio parece pertenecer a un grupo de IAPV que no causa infecciones aparentes y que no es capaz de causar SDC por sí solo, apoyando las conclusiones de nuestro objetivo 1 y otros estudios publicados (Blanchard et al. 2008; Reynaldi et al. 2011).

Por su parte, el virus LSV sólo había sido descrito en EEUU hasta el momento, y en este estudio se describe por primera vez su presencia en abejas europeas. Sin embargo, su efecto patógeno, así como su relevancia epidemiológica y su implicación en la pérdida de colmenas continúa sin conocerse, aunque se sospecha que puede tratarse de alguno de los virus descritos por serología de los que no existe información molecular, como los virus BVX, BVY, Arkansas y Berkeley. Por tanto, se requieren más estudios para conocer la implicación de LSV en la pérdida de colmenas.

Por otro lado, el descubrimiento del TuRSV en la muestra de abejas gracias al enfoque metagenómico requiere de más estudios al respecto, ya que se desconoce a ciencia cierta la razón de la presencia de este virus de plantas en muestras de abejas. La razón más posible es que las abejas sean portadoras pasivas de este virus de plantas, por ejemplo al transportar las partículas de polen, ya que no parece probable que este virus replique en células de abeja. Por tanto, se requieren más estudios que confirmen este hecho, aunque lo que sí se ha observado es que, al menos, las abejas son capaces de actuar como vector mecánico del TuRSV, transmitiendo la infección de planta a planta cuando están polinizando. Además, este descubrimiento pone una vez más de relevancia la estrecha relación de las abejas con el ambiente que rodea las colmenas.

Considerando en conjunto todos estos hallazgos, hemos podido aplicar las posibilidades que ofrece la metagenómica al campo de la virología apícola y al estudio de las causas de fenómenos multifactoriales como la pérdida de colmenas, permitiendo conocer el viroma o el microbioma completo de una muestra de interés, evitando las limitaciones de las técnicas de PCR de rutina. Como resultado de esta aplicación, se ha descrito la coinfección de dos dicistrovirus, un virus no clasificado y la presencia de un virus de planta en una colonia con SDC. Los hallazgos de los virus ALPV y LSV por primera vez en Europa, así como la presencia de un virus de planta en una muestra de abejas ofrecen nuevos interrogantes que pueden dar origen a futuros estudios sobre el papel de estos virus en el SDC. Además, el estudio metagenómico de muestras con SDC abre un enorme campo de posibilidades para desarrollar comparaciones de los microbiomas entre muestras sanas y enfermas, teniendo un enfoque global del fenómeno.

2. Análisis epidemiológico: los virus como parte de un problema multifactorial

Los objetivos 1 y 2 de la presente tesis doctoral se han centrado en evaluar el efecto de la presencia de virus de abeja sobre las pérdidas de colmenas desde el punto de vista del diagnóstico. Sin embargo, en condiciones normales los virus se presentan en infecciones encubiertas que pueden ser toleradas por la colonia sin producir daños a la misma, requiriendo en muchos casos de otros factores para producir infecciones sintomáticas. Además, como se ha observado en el estudio metagenómico, los virus rara vez se encuentran de manera aislada en las colonias, sino que la presencia de coinfecciones es frecuente tanto en muestras de colonias colapsadas, como también en colonias sanas. Por tanto, es necesario integrar el diagnóstico vírico en un análisis global como parte de un problema multifactorial, que considere factores que puedan sumir a la colonia a un estado de estrés que facilite la replicación vírica, tales como factores climáticos, características del hábitat, prácticas de manejo, coinfecciones víricas y presencia de otros patógenos como Varroa y Nosema.

Entre los factores externos a la colonia, el estudio de las prácticas de manejo es especialmente interesante porque ejercen una influencia directa sobre las condiciones de la colmena, tanto internas (por ejemplo, mediante los tratamientos de Varroa) como externas (por ejemplo, mediante la localización del colmenar). Caracterizar las prácticas de manejo que están relacionadas con una mayor o menor presencia viral puede facilitar su optimización, con el objetivo de propiciar las condiciones más idóneas para la colonia y así reducir el efecto de los virus sobre las mismas, previniendo posibles estados patológicos.

En el objetivo 3 de la presente tesis doctoral se ha evaluado el manejo y el estado sanitario de colmenares de una importante región apícola española, Andalucía, a través de la recogida de información mediante encuestas y la evaluación de la presencia y carga de siete virus (DWV, BQCV, ABPV, IAPV, KBV, SBV, CBPV) en primavera-verano y otoño-invierno. Las encuestas revelaron que el perfil del apicultor profesional, aquel que tiene un mayor número de colmenas y mayor tamaño de colmenar, está asociado con una mayor exposición de las colmenas a una alimentación en cultivos, y a un mayor movimiento de colmenas mediante la trashumancia. En cuanto al estado sanitario, la mayor parte de los colmenares en estudio mostró un buen estado sanitario, lo que se reflejó en las

puntuaciones recogidas en las encuestas y en la falta de sintomatología de virus o despoblamiento.

La presencia de virus de abeja fue habitual durante el periodo de estudio, puesto que se encontraron colmenares positivos a seis de los siete virus, siendo BQCV y DWV los más frecuentes y distribuidos, de acuerdo con estudios previos en España (Kukielka et al. 2008a). Entre ambos muestreos las frecuencias y las cargas BQCV e IAPV disminuyeron, CBPV fue detectado sólo en el segundo muestreo. El único virus que mostró un incremento entre ambos muestreos fue DWV, siguiendo la tendencia anual de Varroa, aunque las cargas víricas no superaron los 10^7 CGE/abeja. Estas cargas, junto con la ausencia de síntomas de alas deformadas indican que aunque DWV es frecuente en las colonias, en Andalucía se encuentra en infecciones encubiertas, probablemente favorecidas por el control efectivo de Varroa. Por último, al analizar las asociaciones entre la presencia y carga de virus y algunas prácticas de manejo, se observaron tendencias para BQCV y DWV, especialmente en otoño-invierno, que junto con la tendencia observada para DWV y la estacionalidad de Varroa, es un momento clave en el que se deben extremar las prácticas de manejo para que las colonias superen el invierno con éxito. La carga de BQCV se correlacionó positivamente con el porcentaje del año en cultivos y negativamente, al igual que DWV, con el número total de colmenas, lo que sugiere que los apicultores profesionales, con mayor número de colmenas, tienden a tener menos cantidad de virus en las mismas. La presencia de BQCV y DWV también se relacionó con la alimentación artificial en invierno y la trashumancia fuera de provincia, respectivamente. Así mismo, la profesionalización se vio relacionada con un menor número de virus por colmenar. Por tanto, estos resultados sugieren por un lado que la profesionalización del sector es fundamental tanto para la producción y la polinización como para el mantenimiento del estado sanitario de las colmenas durante el año, pero ponen igualmente de manifiesto la necesidad de estudiar la acción de la trashumancia fuera de provincia, especialmente para polinizar cultivos, en el efecto de los virus sobre la salud de las colmenas. La formación específica y la supervisión de nuevos apicultores para optimizar el manejo podrían asegurar un buen estado sanitario de las colmenas, manteniendo en niveles bajos las infecciones víricas especialmente en otoño-invierno para los virus transmitidos por Varroa, especialmente DWV.

En el objetivo 3 se ha puesto de relevancia la importancia de un manejo óptimo de las colmenas para reducir el posible estrés a las que éstas se ven sometidas. Sin embargo, a

pesar de que mediante la profesionalización del manejo se pueden minimizar las condiciones de estrés sobre la colmena, existen numerosos patógenos que coinfectan una misma colmena, y que por tanto, pueden interactuar entre sí produciendo diversos efectos. La coinfección de patógenos puede potenciar el efecto de algunos de estos patógenos (por ejemplo, mediante sinergias o efecto aditivo), inhibir otros patógenos (por ejemplo, mediante antagonismo), o pueden también inducir estrés en la colmena cuyo resultado es la activación de infecciones encubiertas. Por tanto, como última parte de esta tesis se decidió comprender la relación entre la presencia y carga de seis virus (ABPV, KBV, IAPV, SBV, BQCV y DWV), el microsporidio *Nosema ceranae* y *Varroa destructor* con el debilitamiento de las colmenas en seis colmenares profesionales mantenidos en un entorno natural para minimizar el efecto de otros factores como la presencia de pesticidas en cultivos. El estudio se ha llevado a cabo en dos épocas del año de especial importancia para las colonias: la estación de cría (primavera-verano) y la estación previa a la hibernación de las colmenas (verano-otoño).

En cuanto a la edad de las abejas, destacó la tendencia observada para DWV en la cría ya que se detectaron frecuencias por encima del 65% en la cría en verano otoño, en contraste con estudios previos (Tentcheva et al. 2004). Las cargas víricas fueron más altas en abejas adultas para todos los virus excepto para DWV en verano-otoño, que presentó mayores cargas en las muestras de cría, como ya había sido descrito anteriormente (Gauthier et al. 2007). Esta mayor presencia de DWV en la cría, junto con la presencia de síntomas de las deformadas en verano-otoño puede ser el reflejo de la dinámica de Varroa en las colmenas. A medida que la cría aumenta a lo largo desde la primavera hasta el verano, el ácaro aumenta su tasa de reproducción hasta el final del verano, cuando alcanza su pico máximo. Estudios previos han establecido que la transmisión de DWV a las pupas a través de Varroa es un requisito para la producción de la sintomatología de alas deformadas (Ball and Allen, 1988; Bowen-Walker et al. 1999; Yue and Genersch, 2005; Shen et al. 2005b), pero el factor clave para la aparición de estos síntomas es la replicación del virus dentro del ácaro, aumentando la carga de DWV que es inyectada en la pupa (Yue and Genersch, 2005; Gisder et al. 2009). Por tanto, estos resultados sugieren que el estudio de la cría es esencial para entender la dinámica de DWV en la colonia.

Los resultados a nivel de colonia mostraron un empeoramiento del estado sanitario lo largo del periodo de estudio. De los patógenos estudiados, destaca la detección de ABPV en ambas estaciones, siendo la primera vez que se describe el virus en España, a pesar de

que ya se había incluido en estudios previos de monitorización de virus (Kukielka et al. 2008a) y en encuestas nacionales (RASVE. 2015). Este virus fue, junto con KBV, el menos frecuente, seguidos por IAPV, SBV y *Nosema ceranae*. Los más frecuentes fueron BQCV y DWV, en concordancia con estudios previos en España (Kukielka et al. 2008a) y en Europa (Tentcheva et al. 2006; Berenyi et al. 2006; Gauthier et al. 2007). También se observó que la presencia de varios patógenos coinfectando una misma colonia es frecuente en las dos estaciones, pero es en verano-otoño cuando las colmenas débiles tienen significativamente mayor número de patógenos por colonia, de acuerdo con estudios previos sobre pérdidas invernales (Ravoet et al. 2013; Budge et al. 2015), aunque estos estudios no fueron cuantitativos. En cuanto a la cuantificación de los patógenos, se encontraron altas cargas, del orden de 10^9 CGE/abeja, para BQCV y DWV en ambos muestreos. Se encontró que tanto las frecuencias como las cargas víricas de DWV e IAPV aumentaron del primer al segundo muestreo, siguiendo el ciclo de Varroa, que transmite ambos virus (OIE. 2015), tendencia que fue también observada en el objetivo 3 para DWV. Esta tendencia fue clara para DWV, que aumentó en cuatro de los seis colmenares analizados, de acuerdo con estudios previos (Tentcheva et al. 2006; Martin et al. 2010; Dainat et al. 2012; Nazzi et al. 2012). Si comparamos los resultados obtenidos en Andalucía y en Madrid, en las colonias de Andalucía se ha observado la presencia de al menos seis virus diferentes de abejas, pero a diferencia de las colonias de Madrid las cargas no han superado los 10^7 CEG/abeja y apenas se han observado síntomas víricos evidentes. Tampoco se han observado problemas con Varroa, a pesar de convivir con el ácaro y realizar los tratamientos. Estas diferencias podrían deberse a factores climáticos, ya que Andalucía registra inviernos algo más cortos y con temperaturas más elevadas, pero podrían existir más factores, de modo que estas diferencias pueden ser el punto de partida de otros estudios sobre virus en España.

Al comparar las colonias con población fuerte y débil, se observó que las colonias con población débil tienen mayores cargas de virus, especialmente en el segundo muestreo, donde se observó esta tendencia para BQCV, SBV y, en menor medida, DWV. Estudios previos ya han señalado el papel de los virus como indicadores o predictores de las pérdidas de colonias invernales, en especial DWV *per se* (Highfield et al. 2009; Dainat et al. 2012; Budge et al. 2015) o en combinación con Varroa y otros virus transmitidos por el ácaro (Francis et al. 2013). Estos resultados indican que las acciones llevadas a cabo en verano-otoño para identificar cambios en la carga de patógenos en las colonias pueden anticipar la pérdida de colonias en el invierno en ambientes naturales. Sin embargo, ya que se han

observado coinfecciones de patógenos en la misma colonia, pueden existir interacciones que afecten a las cargas. Por ello se realizaron análisis de correlaciones exploratorios entre las cargas de patógenos en ambos muestreos. En cuanto a virus, sólo se apreció una correlación fuerte entre la carga de BQCV y SBV en ambos muestreos, que sin embargo no se pudo verificar a nivel colmenar y cuyo ajuste a una curva requiere de más estudios. Previsiblemente se encontró una correlación entre la carga de DWV y Varroa durante el segundo muestreo, al igual que numerosos estudios ya habían señalado (Bowen-Walker et al. 1999; Martin. 2001; Sumpter and Martin, 2004; Dainat et al. 2012). Recientemente se ha caracterizado esta relación, definiéndose como una sinergia mediada por el sistema inmune (Nazzi et al. 2012). La presencia de sintomatología evidente de varroosis y alas deformadas, junto con la correlación entre estos dos patógenos indican que nuestros resultados pueden estar en línea con esta publicación, aunque se requieren de estudios centrados en el sistema inmune de las abejas para comprobarlo. Por otro lado, aunque la relación entre DWV y *Nosema ceranae* se ha definido como competitiva (Doublet et al. 2015) y sinérgica (Zheng et al. 2015), no se observó correlación entre ambos patógenos en este estudio, de acuerdo con Martin et al. (Martin et al. 2013).

Para investigar si estas tendencias están influidas por el ambiente, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) en cada muestreo. El ACP es un análisis multivariable que identifica las mayores fuentes de variación (componentes principales) en bases de datos combinando múltiples variables, sin hacer asunciones previas sobre el origen de las muestras (Mondet et al. 2014). Considerando los dos primeros componentes principales (CP) se observó la existencia de dos clústeres, el primero de los cuales contiene las colonias positivas a las variables que explican el CP, y el segundo las colonias negativas. Considerando estos dos clústeres, se observó que las colonias que pertenecen al mismo colmenar tienen un comportamiento similar, comparadas con colonias de colmenares distintos. Estos resultados indican una posible transmisión de patógenos entre colmenas y que las condiciones ambientales y las prácticas de manejo del colmenar tienen un efecto sobre la carga de patógenos.

Por último, el análisis de regresión reveló que en el segundo muestreo la debilidad de las colonias está relacionada con altas cargas de DWV. Sin embargo, la carga de Varroa no fue considerada por este modelo, y tampoco se pudo comprobar el efecto de la relación BQCV-SBV en el debilitamiento de las colmenas, por lo que se requieren más estudios para confirmar estas tendencias.

Por tanto, este objetivo ha servido para esclarecer las diferencias de estado sanitario entre primavera-verano y otoño-invierno y la dinámica de los patógenos en colonias localizadas en ambientes naturales, destacando el papel de DWV en relación con las colonias débiles en altas cargas, su relación con Varroa y la importancia del estudio de este virus en la cría de abejas. Así mismo se han estudiado las relaciones entre patógenos, en especial BQCV-SBV, y se ha descrito la presencia de ABPV por primera vez en España.

3. Perspectivas y líneas de futuro

En la presente tesis doctoral se ha puesto de manifiesto la importancia de mantener el correcto estado sanitario de las abejas, que por su actividad polinizadora son esenciales para la conservación de la agricultura y la biodiversidad de gran parte del planeta. Aunque son numerosos los factores que les afectan y aún quedan muchas cuestiones por resolver, esta tesis ha dejado constancia de que la presencia de virus muy diferentes es frecuente en las colonias, con una variabilidad estacional, en coinfecciones e incluso en altas cargas, por lo que son un factor importante a tener en cuenta ante la pérdida de colmenas, así como su relación con el resto de factores que amenazan la salud de las abejas.

El estudio de la implicación de los virus en la pérdida de colmenas debe enfocarse desde una visión multidisciplinar, que abarque aspectos tanto de los propios virus, como del hospedador y del ambiente que rodea las colmenas. En cuanto a los **virus**, el estudio del binomio DWV-Varroa en el contexto de las colmenas españolas presenta gran interés, en vista de los resultados de esta tesis. En España la totalidad de los apicultores conviven con Varroa, y en cuanto a DWV, este virus tiene una alta prevalencia, un potencial poder patógeno y, además, en la presente tesis se ha asociado en altas cargas con la debilidad de las colonias en verano-otoño. En cuanto al **hospedador**, la integración del estudio del sistema inmune puede suponer no sólo el conocimiento exacto de cómo afectan los virus a la salud de las abejas, sino que ofrece la posibilidad de poner en práctica medidas que refuercen el sistema inmune, ya que las abejas conviven habitualmente con más de un virus en la colonia. En cuanto al **ambiente**, el estudio de los factores ambientales y de manejo capaces de inducir estrés a las colmenas debe acompañar al estudio de los virus, ya que pueden suponer la diferencia entre una infección encubierta sin sintomatología que la colonia puede soportar, y una infección aparente que puede desencadenar el colapso de la colonia.

Por tanto, esta tesis doctoral ha supuesto un gran avance en el estudio de la implicación de los virus en la pérdida de colonias desde una perspectiva multidisciplinar, combinando diagnóstico y epidemiología, pero sin duda ha dejado abierta la puerta a nuevos estudios sobre la pérdida de colonias.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS



PRIMERA/FIRST

A pesar de su patogenicidad, la presencia de IAPV no es indicador por sí solo del SDC en colonias de España, ya que se ha encontrado en colonias sin SDC, tanto en colonias con población fuerte como en colonias débiles y en infecciones encubiertas sin causar síntomas evidentes.

Despite its pathogenicity, the only presence of IAPV is not an indicator by itself of CCD in Spain, as it has been found in colonies without CCD, and in strong and weak colonies carrying covert infections without clear symptomatology.

SEGUNDA/SECOND

Se ha detectado por primera vez en Europa la presencia de los virus ALPV y LSV, en coinfección con IAPV, en una colonia con SDC mediante el empleo de la metagenómica, así como una posible ruta de transmisión del TuRSV a través de polinizadores como las abejas.

The presence of ALPV and LSV, in coinfection with IAPV, has been detected in Europe for the first time in a colony with CCD using a metagenomic approach, as well as a possible route of transmission for TuRSV through pollinators such as honey bees.

TERCERA/THIRD

Las tendencias observadas en otoño-invierno de una menor presencia de BQCV, DWV y coinfecciones con el número total de colmenas y el nivel de dedicación del apicultor indican que la profesionalización y la optimización de las prácticas de manejo pueden suponer un mejor estado sanitario de cara al invierno. Sin embargo, factores como la trashumancia fuera de provincia y la alimentación en cultivos se han relacionado con mayor presencia vírica y requieren de más estudios.

The trends observed in autumn-winter between a lesser presence of BQCV, DWV and coinfections with total number of colonies and the degree of dedication of the beekeeper indicate that professionalization and optimization of managing could mean an improvement of the health status for the overwintering. However, factors such as transhumance to other provinces and feeding in crops have been associated with higher presence of viruses and require more studies.

CUARTA/FOURTH

Se ha detectado por primera vez la presencia de ABPV en España en infecciones encubiertas asintomáticas en colonias localizadas en un entorno natural en la Comunidad Autónoma de Madrid, aunque la determinación de su prevalencia y estacionalidad en España requieren de estudios con mayor número de muestras.

For the first time in Spain ABPV has been detected in covert infections in colonies located in natural environments in the Autonomous Community of Madrid. Nevertheless, more studies with higher number of samples are required for the establishment of its prevalence and seasonality in Spain.

QUINTA/FIFTH

Se ha observado un empeoramiento del estado sanitario de colmenas situadas en entornos naturales entre las estaciones de primavera-verano y verano-otoño, con un aumento de la sintomatología aparente y un aumento de colmenas con población débil relacionado con la dinámica del binomio DWV-Varroa, que debe ser objeto de futuros estudios en los que la toma de muestras de la cría puede ser determinante.

A worsening in the health status of colonies located in natural environments has been observed between spring-summer and summer-autumn seasons, with an increase of the overt symptomatology and the number of colonies with weak population, which has been related with the DWV-Varroa dynamics in the colonies. These trends should be studied in future research where the sampling of brood could be essential.

SEXTA/SIXTH

La presencia de virus en colonias de España es un hecho habitual a tenor de los resultados observados en Madrid y Andalucía, destacando la presencia de altas frecuencias de BQCV y DWV, y de coinfecciones con otros virus, Nosema y Varroa, siendo verano-otoño la época en la que las colmenas débiles presentan mayor número de patógenos.

The presence of viruses in Spanish colonies is common, as observed in the studies in Madrid and Andalucía. Highlights from these studies are the presence of high frequencies of BQCV and DWV, together with coinfections with other viruses, Nosema and Varroa. Summer-autumn was also the season when weak colonies had higher number of pathogens.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Aebi, A., Neumann, P., 2011. Endosymbionts and honey bee colony losses? environmental sciences 59, 699-701.
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., Le Conte, Y., 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. Biol. Lett.
- Allen, M.F., Ball, B.V., White, R.F., Antoniw, J.F., 1986. The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA. J. Apic. Res. 25, 100–105.
- Allen, M., Ball, B., 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. Bee World 77, 141-162.
- Anderson, D.L., Gibbs, A.J., 1988. Inapparent virus infections and their interactions in pupae of the honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus) in Australia. J. Gen. Virol. 69, 1617.
- Anderson, D., 1991. Kashmir bee virus--a relatively harmless virus of honey bee colonies. Am. Bee J.
- Antunez, K., Anido, M., Garrido-Bailon, E., Botias, C., Zunino, P., Martinez-Salvador, A., Martin-Hernandez, R., Higes, M., 2012. Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. Res. Vet. Sci. 93, 1441-1445.
- Aronstein, K.A., Murray, K.D., 2010. Chalkbrood disease in honey bees. J. Invertebr. Pathol. 103 Suppl 1, S20-9.
- Ashman, T., Knight, T.M., Steets, J.A., Amarasekare, P., Burd, M., Campbell, D.R., Dudash, M.R., Johnston, M.O., Mazer, S.J., Mitchell, R.J., 2004. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. Ecology 85, 2408-2421.
- Bacandritsos, N., Granato, A., Budge, G., Papanastasiou, I., Roinioti, E., Caldon, M., Falcaro, C., Gallina, A., Mutinelli, F., 2010. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. J. Invertebr. Pathol. 105, 335-340.
- Bailey, L., 1967. Acute bee-paralysis virus in adult honey bees injected with sacbrood virus. Virology 33, 368.
- Bailey, L., 1968. Honey bee pathology. Annu. Rev. Entomol. 13, 191-212.
- Bailey, L., Ball, B.V., 1991. Honey bee pathology. Elsevier, .
- Bailey, L., Carpenter, J.M., Woods, R.D., 1979. Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus. J. Gen. Virol. 43, 641.
- Bailey, L., Gibbs, A.J., Gibbs, J., 1964a. Acute infection of bees with paralysis virus. J. Insect Pathol 6, 395-407.

- Bailey, L., Ball, B.V., Carpenter, J., Woods, R., 1980. Small virus-like particles in honey bees associated with chronic paralysis virus and with a previously undescribed disease. *J. Gen. Virol.* 46, 149-155.
- Bailey, L., Ball, B.V., Perry, J., 1983. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann. Appl. Biol.* 103, 13-20.
- Bailey, L., Ball, B., Perry, J., 1981. The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Ann. Appl. Biol.* 97, 109-118.
- Bailey, L., Gibbs, A., Woods, R., 1964b. Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 23, 425-429.
- Bailey, L., Gibbs, A., Woods, R., 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 21, 390-395.
- Bailey, L., Woods, R., 1977. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *J. Gen. Virol.* 37, 175-182.
- Bailey, L., 1963. *Infectious Diseases of the Honey-bee*. Land Books Ltd., London.
- Ball, B.V., Allen, M.F., 1988. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann. Appl. Biol.* 113, 237-244.
- Ball, B.V., Bailey, L., 1997. Viruses. Honey bee pests, predators & diseases, AI Root Company, Medina , 11–32.
- Ball, B., 1993. The damaging effects of *Varroa jacobsoni* infestation. In: Matheson, A. (Ed.), *Living with Varroa*. International Bee Research Association Cardiff, United Kingdom, pp. 9-16.
- Bayer-Wilfert, L., Schroeder, D., Mordecai, G., Martin, S., Jones, I., In press. Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. *ISMEJ* .
- Bekesi, L., Ball, B.V., Dobos-Kovacs, M., Bakonyi, T., Rusvai, M., 1999. Occurrence of acute paralysis virus of the honey bee (*Apis mellifera*) in a Hungarian apiary infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Acta Vet. Hung.* 47, 319-324.
- Berenyi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Koglbberger, H., Nowotny, N., 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2414-2420.
- Blanchard, P., Schurr, F., Celle, O., Cougoule, N., Drajnudel, P., Thiery, R., Faucon, J.P., Ribiere, M., 2008. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 99, 348-350.
- Blomström, A., 2011. Viral metagenomics as an emerging and powerful tool in veterinary medicine. *Vet. Q.* 31, 107-114.

- Blomström, A., 2010. Applications of viral metagenomics in the veterinary field. 2010.
- Blomström, A., Belák, S., Fossum, C., Fuxler, L., Wallgren, P., Berg, M., 2010. Studies of porcine circovirus type 2, porcine bocavirus and torque teno virus indicate the presence of multiple viral infections in postweaning multisystemic wasting syndrome pigs. *Virus Res.* 152, 59-64.
- Blomstrom, A.L., Belak, S., Fossum, C., McKillen, J., Allan, G., Wallgren, P., Berg, M., 2009. Detection of a novel porcine bocavirus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Res.* 146, 125-129.
- Blomstrom, A.L., Widen, F., Hammer, A.S., Belak, S., Berg, M., 2010. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4392-4396.
- Bogdanov, S., 2006. Contaminants of bee products1. *Apidologie* 37, 1-18.
- Boncrisiani, H.F., Evans, J.D., Chen, Y., Pettis, J., Murphy, C., Lopez, D.L., Simone-Finstrom, M., Strand, M., Tarpy, D.R., Rueppell, O., 2013. In vitro infection of pupae with Israeli acute paralysis virus suggests disturbance of transcriptional homeostasis in honey bees (*Apis mellifera*).
- Bowen-Walker, P., Martin, S., Gunn, A., 1999. The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera* L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J. Invertebr. Pathol.* 73, 101-106.
- Budge, G.E., Pietravalle, S., Brown, M., Laurenson, L., Jones, B., Tomkies, V., Delaplane, K.S., 2015. Pathogens as Predictors of Honey Bee Colony Strength in England and Wales. *PLoS One* 10, e0133228.
- Carter, M., Genersch, E., 2008. Molecular characterisation of honey bee viruses. In: Aubert, M., Ball, B.V., Fries, I. et al (Eds.), *Virology and the honey bee*. European Commission, .
- Chauzat, M., Laurent, M., Riviere, M., Saugeon, C., Hendrikx, P., Ribire-Chabert, M., 2014. Epilobee—A Pan-European Epidemiological Study on Honeybee Colony Losses 2012–2013. Sophia Antipolis, France: European Union Reference Laboratory for Honeybee Health (EURL) .
- Chen, Y.P., Pettis, J.S., Corona, M., Chen, W.P., Li, C.J., Spivak, M., Visscher, P.K., DeGrandi-Hoffman, G., Boncrisiani, H., Zhao, Y., 2014. Israeli acute paralysis virus: epidemiology, pathogenesis and implications for honey bee health.
- Chen, Y., Evans, J.D., 2007. Historical presence of Israeli acute paralysis virus in the United States. *Am. Bee J.* 147, 1027-1028.
- Chen, Y., Evans, J.D., Smith, I.B., Pettis, J.S., 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 186-188.

- Chen, Y., Pettis, J.S., Evans, J.D., Kramer, M., Feldlaufer, M.F., 2004a. Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie* 35, 441-448.
- Chen, Y., Zhao, Y., Hammond, J., Hsu, H., Evans, J., Feldlaufer, M., 2004b. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 87, 84-93.
- Chen, Y., Evans, J., Feldlaufer, M., 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 152-159.
- Cornman, R.S., Tarpy, D.R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J.S., Evans, J.D., 2012. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS One* 7, e43562.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283-287.
- Crane, E.E., 2013. The world history of beekeeping and honey hunting. Routledge, .
- Currie, R.W., Pernal, S.F., Guzmán-Novoa, E., 2010. Honey bee colony losses in Canada. *J. Apic. Res.* 49, 104-106.
- Dainat, B., Ken, T., Berthoud, H., Neumann, P., 2009. The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* (Acari, Laelapidae) as a vector of honeybee viruses. *Insectes Soc.* 56, 40-43.
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One* 7, e32151.
- Dall, D., 1987. Multiplication of Kashmir bee virus in pupae of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 49, 279-290.
- Davison, S., Leat, N., Benjeddou, M., 2004. Development of molecular tools for honeybee virus research: the South African contribution. *African Journal of Biotechnology* 2, 698-713.
- de Groot, A.P., 1953. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.)... W. Junk, .
- de Miranda, J.R., 2008. Diagnostic techniques for virus detection in honey bees. In: Aubert, M., Ball, B.V., Fries, I. et al (Eds.), *Virology and the honey bee*. European Commission, .
- de Miranda, J.R., Bailey, L., Ball, B.V., Blanchard, P., Budge, G.E., Chejanovsky, N., Chen, Y., Gauthier, L., Genersch, E., de Graaf, D.C., 2013. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 52, 1-56.

- de Miranda, J.R., Cordoni, G., Budge, G., 2010a. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl 1, S30-47.
- de Miranda, J.R., Cordoni, G., Budge, G., 2010b. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl 1, S30-47.
- de Miranda, J.R., Genersch, E., 2010. Deformed wing virus. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl 1, S48-61.
- Delwart, E.L., 2007. Viral metagenomics. *Rev. Med. Virol.* 17, 115-131.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81-106.
- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani, H.F., Jr, Evans, J.D., Chen, Y., 2011. *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Gen. Virol.* 92, 151-155.
- Doublet, V., Natsopoulou, M.E., Zschiesche, L., Paxton, R.J., 2015. Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *J. Invertebr. Pathol.* 124, 31-34.
- EFSA, 2012a. Scientific Opinion on the science behind the development of a risk assessment of Plant Protection Products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *The EFSA Journal* 10, 275.
- EFSA, 2012b. Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe. *EFSA J* 10, 2752-2779.
- Engel, P., Moran, N.A., 2013. Functional and evolutionary insights into the simple yet specific gut microbiota of the honey bee from metagenomic analysis. *Gut microbes* 4, 60-65.
- Engel, P., Martinson, V.G., Moran, N.A., 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 11002-11007.
- Evans, J.D., Schwarz, R.S., Chen, Y.P., Budge, G., Cornman, R.S., De la Rúa, P., de Miranda, J.R., Foret, S., Foster, L., Gauthier, L., 2013. Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 52, 1-54.
- Eyer, M., Chen, Y.P., Schäfer, M.O., Pettis, J., Neumann, P., 2009. Small hive beetle, *Aethina tumida*, as a potential biological vector of honeybee viruses. *Apidologie* 40, 419-428.
- Faucon, J.P., Mathieu, L., Ribiere, M., Martel, A.C., Drajnudel, P., Zeggane, S., Aurieres, C., Aubert, M.F.A., 2002. Honey bee winter mortality in France in 1999 and 2000. *Bee World* 83, 14-23.

- Faucon, J.P., Vitu, C., Russo, P., Vignoni, M., 1992. Diagnostic de la paralysie aiguë: application à l'épidémiologie des maladies virales de l'abeille en France en 1990. *Apidologie* 23, 139-146.
- Fernandez, J.M., Puerta, F., Cousinou, M., Dios-Palomares, R., Campano, F., Redondo, L., 2012. Asymptomatic presence of *Nosema* spp. in Spanish commercial apiaries. *J. Invertebr. Pathol.* 111, 106-110.
- Fievet, J., Tentcheva, D., Gauthier, L., de Miranda, J., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2006. Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virol. J.* 3, 16.
- Flores, J., Gutiérrez, I., Puerta, F., Ruiz, J., 2000. Principales enfermedades de la cria de abejas. *MG Mundo ganadero* , 70-75.
- Flores, J., Ruiz, J., Ruz, J., Puerta, F., Bustos, M., Padilla, F., Campano, F., 1996. Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. *Apidologie* 27, 185-192.
- Forsgren, E., 2010. European foulbrood in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S5-S9.
- Francis, R.M., Nielsen, S.L., Kryger, P., 2013. Varroa-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS One* 8, e57540.
- Fries, I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 103, S73-S79.
- Fries, I., Ekbohm, G., Villumstad, E., 1984. *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. *J. Apic. Res.* 23, 102-105.
- Fujiyuki, T., Takeuchi, H., Ono, M., Ohka, S., Sasaki, T., Nomoto, A., Kubo, T., 2004. Novel insect picorna-like virus identified in the brains of aggressive worker honeybees. *J. Virol.* 78, 1093-1100.
- Gallai, N., Salles, J., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68, 810-821.
- Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R., Bernal, J., Bernal, J.L., Martínez-Salvador, A., Barrios, L., Meana, A., Higes, M., 2010. Short communication. The detection of Israeli Acute Paralysis virus (IAPV), fipronil and imidacloprid in professional apiaries are not related with massive honey bee colony loss in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8, 658-661.
- Gauthier, L., Tentcheva, D., Tournaire, M., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2007. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie* 38, 426-435.
- Genersch, E., Von Der OHE, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., 2010. The German bee monitoring project: a

- long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41, 332-352.
- Genersch, E., Yue, C., Fries, I., de Miranda, J.R., 2006. Detection of deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *J. Invertebr. Pathol.* 91, 61-63.
- Genersch, E., 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl 1, S10-9.
- Genersch, E., Aubert, M., 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet. Res.* 41, 54.
- Gisder, S., Aumeier, P., Genersch, E., 2009. Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 90, 463-467.
- Glinski, Z., Buczek, K., 2003. Response of the Apoidea to fungal infections. *Apiacta* 38, 183-189.
- Gupta, R.K., Reybroeck, W., van Veen, J.W., Gupta, A., 2014. *Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood Security*. Springer, .
- Hails, R.S., Ball, B.V., Genersch, E., 2008. Infection strategies of insect viruses. In: Aubert, M., Ball, B.V., Fries, I. et al (Eds.), *Virology and the honey bee*. European Commission, .
- Harris, J., Harbo, J., Villa, J., Danka, R., 2003. Variable population growth of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) during a 10-year period. *Environ. Entomol.* 32, 1305-1312.
- Harrison, J.F., Fewell, J.H., 2002. Environmental and genetic influences on flight metabolic rate in the honey bee, *Apis mellifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 133, 323-333.
- Hartmann, U., Forsgren, E., Charrière, J., Neumann, P., Gauthier, L., 2015. Dynamics of *Apis mellifera* Filamentous Virus (AmFV) Infections in Honey Bees and Relationships with Other Parasites. *Viruses* 7, 2654-2667.
- Hatjina, F., Bouga, M., Karatasou, A., Kontothanasi, A., Charistos, L., Emmanouil, C., Emmanouil, N., Maistros, A., 2010. Data on honey bee losses in Greece: a preliminary note. *J. Apic. Res.* 49, 116-118.
- Higes, M., Martin, R., Meana, A., 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 93-95.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Botias, C., Bailon, E.G., Gonzalez-Porto, A.V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jimenez, J.J., Palencia, P.G., Meana, A., 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10, 2659-2669.

- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., García-Palencia, P., Meana, A., Del Nozal, M.J., Mayo, R., Bernal, J.L., 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 110-113.
- Higes, M., Sanz, A., Meana, A., Martín, R., García, P., Álvarez, N., Sanz, A., 2005. El Síndrome de despoblamiento de las Colmenas en España: consideraciones sobre su origen. *Vida apícola: revista de apicultura*, 15-21.
- Highfield, A.C., El Nagar, A., Mackinder, L.C., Noel, L.M., Hall, M.J., Martin, S.J., Schroeder, D.C., 2009. Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7212-7220.
- Hunter, W.B., 2010. Medium for development of bee cell cultures (*Apis mellifera*: Hymenoptera: Apidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 46, 83-86.
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I.H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., Katz, H., Gardiol, G., Mendoza, Y., 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 150-153.
- Iqbal, J., Mueller, U., 2007. Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers. *Proc. Biol. Sci.* 274, 1517-1521.
- Jaffe, R., Dietemann, V., Allsopp, M.H., Costa, C., Crewe, R.M., DALL'OLIO, R., de la Rua, P., EL-NIWEIRI, M.A., Fries, I., Kezic, N., 2010. Estimating the density of honeybee colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censuses. *Conserv. Biol.* 24, 583-593.
- Kimmel, S., Kuhn, J., Harst, W., Stever, H., 2007. Electromagnetic radiation: influences on honeybees (*Apis mellifera*).
- Klein, A.M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tschamntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274, 303.
- Kukielka, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2010. Short communication. First detection of Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV) in Spanish honeybees. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8, 308-311.
- Kukielka, D., Esperon, F., Higes, M., Sánchez-Vizcaino, J.M., 2008a. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J. Virol. Methods* 147, 275-281.
- Kukielka, D., Esperon, F., Higes, M., Sánchez-Vizcaino, J.M., 2008b. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J. Virol. Methods* 147, 275-281.
- Kukielka, D., Sánchez-Vizcaino, J.M., 2009. One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of Sacbrood honeybee and Acute bee paralysis viruses. *J. Virol. Methods* 161, 240-246.

- Langstroth, L., 1852. Patent for the Langstroth bee hive.
- Liu, S., Vijayendran, D., Carrillo-Tripp, J., Miller, W.A., Bonning, B.C., 2014. Analysis of new aphid lethal paralysis virus (ALPV) isolates suggests evolution of two ALPV species. *J. Gen. Virol.* 95, 2809-2819.
- Llorente, J., 2003. Principales enfermedades de las abejas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. , 158.
- MAGRAMA, 2015. El sector de la miel en cifras. Principales indicadores económicos en 2014.
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E., Sela, I., 2007a. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J. Gen. Virol.* 88, 3428-3438.
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E., Sela, I., 2007b. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J. Gen. Virol.* 88, 3428-3438.
- Martin, S.J., 2001. The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *J. Appl. Ecol.* 38, 1082-1093.
- Martin, S.J., Ball, B.V., Carreck, N.L., 2010. Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide-treated Varroa destructor infested honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J. Apic. Res.* 49, 72-79.
- Martin, S.J., Hardy, J., Villalobos, E., Martin-Hernandez, R., Nikaido, S., Higes, M., 2013. Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically? *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 506-510.
- Martin, S.J., Highfield, A.C., Brettell, L., Villalobos, E.M., Budge, G.E., Powell, M., Nikaido, S., Schroeder, D.C., 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* 336, 1304-1306.
- Mondet, F., de Miranda, J.R., Kretzschmar, A., Le Conte, Y., Mercer, A.R., 2014. On the front line: quantitative virus dynamics in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies along a new expansion front of the parasite Varroa destructor. *PLoS pathogens* 10, e1004323.
- Moritz, R.F., Kraus, F.B., Kryger, P., Crewe, R.M., 2007. The size of wild honeybee populations (*Apis mellifera*) and its implications for the conservation of honeybees. *J. Insect Conserv.* 11, 391-397.
- Mullis, K.B., Erlich, H.A., Arnheim, N., Horn, G.T., Saiki, R.K., Scharf, S.J., 1987. One of the first Polymerase Chain Reaction (PCR) patents .
- Nazzi, F., Brown, S.P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., Varricchio, P., Della Vedova, G., Cattonaro, F., Caprio, E., Pennacchio, F., 2012. Synergistic parasite-

- pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathogens* 8, e1002735.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, .
- Neumann, P., Carreck, N.L., 2010. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49, 1-6.
- Nielsen, S.L., Nicolaisen, M., Kryger, P., 2008. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie* 39, 310-314.
- OIE, 2015a. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. Capítulo 9.5. Infestación de las abejas melíferas por ácaros tropilaelaps.
 . 2015.
- OIE, 2015b. WAHID. Información zoosanitaria mundial. 2015.
- Ongus, J.R., Peters, D., Bonmatin, J.M., Bengsch, E., Vlak, J.M., van Oers, M.M., 2004. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *J. Gen. Virol.* 85, 3747-3755.
- Pajuelo, A., 2005. Desaparición de abejas y mortandades de colmenas en otoño-invierno 2004-2005 en España. *Vida apícola: revista de apicultura* , 22-27.
- Pajuelo, A., Molins, J.L., Perez, F., 1988. The situation of *Varroa jacobsoni* in Spain.
- Palacios, G., Hui, J., Quan, P.L., Kalkstein, A., Honkavuori, K.S., Bussetti, A.V., Conlan, S., Evans, J., Chen, Y.P., vanEngelsdorp, D., Efrat, H., Pettis, J., Cox-Foster, D., Holmes, E.C., Briese, T., Lipkin, W.I., 2008. Genetic analysis of Israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States. *J. Virol.* 82, 6209-6217.
- Paxton, R.J., Klee, J., Korpela, S., Fries, I., 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38, 558-565.
- Pirk, C.W., De Miranda, J.R., Kramer, M., Murray, T.E., Nazzi, F., Shutler, D., Van der Steen, Jozef JM, Van Dooremalen, C., 2013. Statistical guidelines for *Apis mellifera* research. *J. Apic. Res.* 52, 1-24.
- Pohorecka, K., Bober, A., Skubida, M., Zdanska, D., 2011. Epizootic status of apiaries with massive losses of bee colonies (2008-2009). *J. Apic. Sci* 55, 137-150.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010a. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in ecology & evolution* 25, 345-353.
- Potts, S.G., Roberts, S.P., Dean, R., Marris, G., Brown, M.A., Jones, R., Neumann, P., Settele, J., 2010b. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J. Apic. Res.* 49, 15-22.

- Puerta, F., FLORES, J.M., RUIZ, J.A., RUZ, J.M., CAMPANO, F., 2001. Enfermedades de las abejas. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Ed.COAG Andalucía.Consejería de Agricultura y Pesca.Junta de Andalucía .
- Puerta, F., Flores, J., Bustos, M., Padilla, F., Campano, F., 1994. Chalkbrood development in honeybee brood under controlled conditions. *Apidologie* 25, 540-546.
- Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smagghe, G., de Graaf, D.C., 2013. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS One* 8, e72443.
- Reynaldi, F.J., Sguazza, G.H., Tizzano, M.A., Fuentealba, N., Galosi, C.M., Pecoraro, M.R., 2011. First report of Israeli acute paralysis virus in asymptomatic hives of Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 43, 84-86.
- Ribiere, M., Ball, B.V., Aubert, M.F.A., 2008. Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. In: Aubert, M., Ball, B.V., Fries, I. et al (Eds.), *Virology and the honey bee*. European Comission, .
- Rose, R., Dively, G.P., Pettis, J., 2007. Effects of Bt corn pollen on honey bees: emphasis on protocol development. *Apidologie* 38, 368-377.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl 1, S96-119.
- Runckel, C., Flenniken, M.L., Engel, J.C., Ruby, J.G., Ganem, D., Andino, R., DeRisi, J.L., 2011. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PloS one* 6, e20656.
- Ryabov, E.V., Wood, G.R., Fannon, J.M., Moore, J.D., Bull, J.C., Chandler, D., Mead, A., Burroughs, N., Evans, D.J., 2014. A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or in vitro, transmission.
- Schroeder, D.C., Martin, S.J., 2012. Deformed wing virus: the main suspect in unexplained honeybee deaths worldwide. *Virulence* 3, 589-591.
- Shen, M., Yang, X., Cox-Foster, D., Cui, L., 2005a. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* 342, 141-149.
- Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N., Cox-Foster, D., 2005b. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J. Gen. Virol.* 86, 2281-2289.
- Shimanuki, H., Calderone, N.W., Knox, D.A., 1994. Parasitic mite syndrome: the symptoms. *American bee journal (USA)* 134, 827-828.
- Siede, R., Berg, S., Meixner, M., 2008. Effects of symptomless infections with *Nosema* sp. on honey bee colonies.

- Sumpter, D.J., Martin, S.J., 2004. The dynamics of virus epidemics in Varroa-infested honey bee colonies. *J. Anim. Ecol.* 73, 51-63.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- Tang, P., Chiu, C., 2010. Metagenomics for the discovery of novel human viruses. *Future microbiology* 5, 177-189.
- Teixeira, E.W., Chen, Y., Message, D., Pettis, J., Evans, J.D., 2008. Virus infections in Brazilian honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 117-119.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Bagny, L., Fievet, J., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2006. Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie* 37, 41.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7185-7191.
- Todd, J.H., De Miranda, J.R., Ball, B.V., 2007. Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie* 38, 354-367.
- Underwood, R.M., VanEngelsdorp, D., 2007. Colony Collapse Disorder: Have We Seen This Before? .
- van der Zee, R., Pisa, L., Andonov, S., Brodschneider, R., Charrière, J., Chlebo, R., Coffey, M.F., Crailsheim, K., Dahle, B., Gajda, A., 2012. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 2009–10. *J. Apic. Res.* 51, 100-114.
- Van Munster, M., Dulleman, A.M., Verbeek, M., Van Den Heuvel, J.F., Clerivet, A., Van Der Wilk, F., 2002a. Sequence analysis and genomic organization of Aphid lethal paralysis virus: a new member of the family Dicistroviridae. *J. Gen. Virol.* 83, 3131-3138.
- Van Munster, M., Dulleman, A.M., Verbeek, M., Van Den Heuvel, J.F., Clerivet, A., Van Der Wilk, F., 2002b. Sequence analysis and genomic organization of Aphid lethal paralysis virus: a new member of the family Dicistroviridae. *J. Gen. Virol.* 83, 3131-3138.
- vanEngelsdorp, D., Caron, D., Hayes, J., Underwood, R., Henson, M., Rennich, K., Spleen, A., Andree, M., Snyder, R., Lee, K., 2012. A national survey of managed honey bee 2010–11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *J. Apic. Res.* 51, 115-124.
- Vanengelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D.R., Pettis, J.S., 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4, e6481.

- VanEngelsdorp, D., Hayes Jr, J., Underwood, R.M., Pettis, J., 2008. A survey of honey bee colony losses in the US, fall 2007 to spring 2008. *PLoS One* 3, e4071.
- vanEngelsdorp, D., Hayes Jr, J., Underwood, R.M., Caron, D., Pettis, J., 2011. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *J. Apic. Res.* 50, 1-10.
- vanEngelsdorp, D., Hayes Jr, J., Underwood, R.M., Pettis, J.S., 2010. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *J. Apic. Res.* 49, 7-14.
- VanEngelsdorp, D., Meixner, M.D., 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S80-S95.
- Williams, I., 1994. The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agricultural Zoology Reviews (United Kingdom)* .
- Woodward, M., 2013. *Epidemiology: study design and data analysis*. CRC Press, .
- Yang, X., Cox-Foster, D.L., 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7470-7475.
- Yue, C., Schröder, M., Bienefeld, K., Genersch, E., 2006. Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): evidence for vertical transmission of viruses through drones. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 105-108.
- Yue, C., Genersch, E., 2005. RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 86, 3419-3424.
- Zheng, H.Q., Gong, H.R., Huang, S.K., Sohr, A., Hu, F.L., Chen, Y.P., 2015. Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus. *Vet. Microbiol.* 177, 1-6.

ANEXOS



Encuesta sanitaria empleada en el objetivo 3



Dpto. Sanidad Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de
Madrid (U.C.M)

INFORMACIÓN QUE ACOMPAÑARÁ A LAS MUESTRAS:

DATOS GENERALES

A) Localización del colmenar:

- a. Provincia, Municipio y Finca
- b. Incluir coordenadas UTM, si se dispone:

B) Perfil de la explotación:

- a. Nº total de colmenas
- b. Nº medio de colmenas por colmenar
- c. Definir grado de dedicación: (tiempo completo, media jornada, hobby)

C) Multiplicación o Renovación del colmenar:

- a. Propia explotación
- b. Otra explotación:
 - b.1) %:
 - b.2) Procedencia:
 - 1. De la Provincia
 - 2. De la Comunidad Autónoma
 - 3. De otra Comunidad Autónoma

D) Alimentación:

- a. Periodo en zonas silvestres: 100%, 50%, 25%, 10%. Citar cuáles
- b. Periodo en cultivos: 100%, 50%, 25%, 10%. Citar cuáles
- c. Estimulante de primavera. Citar composición
- d. Mantenimiento de invierno. Citar composición
- e. Preparados proteicos. Marca: _____
- f. Preparados vitaminas y minerales. Marca: _____

E) Trashumancia:

- a. No se realiza
- b. Sí se realiza:
 - b.1) %:
 - b.2) Destino:
 - 1. En la Provincia
 - 2. En la Comunidad Autónoma
 - 3. Fuera de la Comunidad Autónoma

F) Deriva. Medios para corregirla:

- a. Disposición especial de colmenas
- b. Distancia de separación entre colmenas
- c. Piquera pintada
- d. Nada de lo anterior

G) Pillaje en el colmenar donde se toma la muestra. Se observa:

- a. Con frecuencia
- b. Raramente
- c. No se observa

ESTADO SANITARIO**H) Estado general observado.** Valorar de 0 a 10 (10 óptimo)**I) Grado de control de Varroa general en el colmenar:**

- a. Bueno
- b. Con problemas
- c. Crítico

J) Presencia de “Pollo escayolado” en piquera y alrededores de la colmena de la muestra:

- a. No se aprecian momias
- b. Sí se ve alguna momia

K) Síntomas de loque/pseudoloques (con olor a agrio apreciable exteriormente) detectados en la colmena de la muestra:

- a. No se aprecia
- b. No se aprecia, pero el apicultor ha tenido algún brote en ese colmenar en los últimos dos años
- c. Se aprecia

L) ¿Ha observado “ladronas negras” en el colmenar donde ha tomado la muestra?

- a. No
- b. Sí. Especificar cuándo y en qué grado

M) Otros problemas que debilitan las colmenas del colmenar donde se ha tomado la muestra:

- a. Causa desconocida
- b. Causa conocida. Describir. Cómo se manifiesta:

N) Historial de tratamientos aplicados en el colmenar donde se toma la muestra

- a. Acaricida para Varroa:
 - Producto y fecha 1^{er} tratamiento
 - Producto y fecha 2^o tratamiento
- b. Otros tratamientos. Especificar

Observaciones:

Otros trabajos realizados durante el doctorado

- En relación con virus de abeja: trabajos realizados durante la estancia en Mánchester (Febrero-Abril 2015):

Correira, E., **Vicente-Rubiano, M.**, Brettel, L., Martin, S.J. “Are honeybee glands effected by deformed wing virus?” Pendiente de envío a la revista científica.

Laura E. Brettell †, Gideon J. Mordecai †, Declan C. Schroeder , Ian M. Jones , Jessica R. Da Silva , **Marina Vicente-Rubiano** and Stephen J. Martin. “A comparison of Deformed Wing Virus in asymptomatic and symptomatic honey bees”. Viruses, 2015.

Abstract: Deformed Wing Virus (DWV) in association with Varroa destructor, is currently the most important pathogen of the western honeybee (*Apis mellifera*). The appearance of deformed adults within an infested colony has long been associated with colony loss however little is known about why only a fraction of DWV positive individuals develop deformed wings. Using qRT-PCR we found that in asymptomatic bees, those parasitised by Varroa as pupae had higher DWV loads than bees free of the mite during their development but there was no effect on wing morphology. Deformed bees contained the highest viral load. DWV consists of a population of related sequences around two master variants; type A, associated with colony losses, and type B, originally named VDV-1. Next generation sequencing (NGS) revealed no consistent differences between paired deformed and asymptomatic samples from three different locations, with the greatest variation seen between locations. However, sequence differences were still apparent between deformed and asymptomatic paired samples and all samples except one were dominated by the DWV type A variant. This suggests that there is no one dominant genetic variant associated with wing deformity, but that all variants have the potential to cause deformity if they reach a sufficiently high load.

Keywords: Deformed Wing Virus; honeybee; Varroa; Next Generation Sequencing; RT-PCR

➤ Otras publicaciones en relación a la sanidad animal:

Vicente-Rubiano, M., Martínez-López, B., Sánchez-Vizcaíno, F. and Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2012). A New Approach for Rapidly Assessing the Risk of Aujeszky's Disease Reintroduction into a Disease-free Spanish Territory by Analysing the Movement of Live Pigs and Potential Contacts with Wild Boar. *Transboundary and Emerging diseases*, 61(4), 350-361.

Rodríguez-Prieto V.*, **Vicente-Rubiano M***, Sánchez-Matamoros A., Rubio-Guerri C., Melero M., Martínez-López B., Martínez-Avilés M., Hoinville L., Vergne T., Comin A., Schauer B., Dórea F., Pfeiffer DU., Sánchez-Vizcaíno JM. (2014). Systematic review of surveillance systems and methods for early detection of exotic, new and re-emerging diseases in animal populations. *Epidemiology and Infection*, 1-25. * first authors.

ORIGINAL ARTICLE

A New Approach for Rapidly Assessing the Risk of Aujeszky's Disease Reintroduction into a Disease-free Spanish Territory by Analysing the Movement of Live Pigs and Potential Contacts with Wild Boar

M. Vicente-Rubiano¹, B. Martínez-López^{1,2}, F. Sánchez-Vizcaíno¹ and J.M. Sánchez-Vizcaíno¹

¹ VISAVET Center and Animal Health Department, Faculty of Veterinary Science, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

² IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Ciudad Real, Spain

Keywords:

Aujeszky's disease; methodological framework; cluster analysis; pig movements; risk-based surveillance; Spain

Correspondence:

M. Vicente-Rubiano. VISAVET Center and Animal Health Department, Faculty of Veterinary Science, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain.
Tel.: +34 91 394 37 02;
Fax: +34 91 394 39 08;
E-mail: marina@sanidadanimal.info

Received for publication July 19, 2012

doi:10.1111/tbed.12041

Summary

Aujeszky's disease (AD) causes significant economic losses in the Spanish pig sector due to import trade restrictions imposed by disease-free countries. Most regions of Spain have achieved 'low AD prevalence' status as a result of an intensive national AD eradication programme involving vaccination and other measures. However, to achieve AD-free status that would eliminate trade restrictions, vaccination must be stopped. For this final stage of eradication, up to date and reliable estimates of the risk of AD reintroduction are essential. Here, we propose an approach based on spatio-temporal scan statistics that assesses risk of AD reintroduction in a disease-free territory by analysing the two most frequent risk pathways: movement of live domestic pigs and contact with wildlife reservoirs. The approach is illustrated using the case of Navarre, one of the first Spanish regions which plan to stop vaccination. Moreover, direct contacts among pig farms in Navarre were used to evaluate the potential spread of AD in the event of reintroduction. Areas at highest risk of AD reintroduction were in the southern part of the region during the second half of the year through pig movements and in the western and east-central parts of Navarre through contact with wild boars. Northern Navarre, despite having the highest density of pig farms, seems to be at low risk of AD reintroduction. Analysing the network of pig movements within Navarre revealed distinct northern and southern compartments that may be used in preventive compartmentalization strategies to reduce potential risk of AD re-infection in the scenario without vaccination. The approach described here may be extended to other regions and may be useful for guiding risk-based measures that reduce the risk of AD re-infection in a more cost-effective manner. Such analysis in Spain may allow authorities to stop vaccination in the safest possible way.

Introduction

Aujeszky's disease (AD), also known as pseudorabies, is an infectious viral disease that has significant health and economic effects in affected regions. Aujeszky's disease is caused by infection with Aujeszky's disease virus (ADV), a member of the *Herpesviridae* family. Natural ADV hosts are domestic pigs, feral pigs and wild boars (*Sus scrofa*) (Kluge

et al., 1999); in all these animals, the virus can cause high morbidity. Aujeszky's disease virus may also produce fatal infections in a wide range of dead-end domestic hosts (Wittmann, 1986) and wild hosts (Kirkpatrick et al., 1980).

Since the first description of AD in the early 20th century (Skoda, 1976), the European Union (EU) has been among the most AD affected regions worldwide. Aujeszky's disease epidemics have caused significant economic losses in several



REVIEW ARTICLE

Systematic review of surveillance systems and methods for early detection of exotic, new and re-emerging diseases in animal populations

V. RODRÍGUEZ-PRieto^{1*}†, M. VICENTE-RUBIANO^{1†}, A. SÁNCHEZ-MATAMOROS^{1,2}, C. RUBIO-GUERRI¹, M. MELERO¹, B. MARTÍNEZ-LÓPEZ^{1,3}, M. MARTÍNEZ-AVILÉS¹, L. HOINVILLE⁴, T. VERGNE⁵, A. COMIN⁶, B. SCHAUER⁷, F. DÓREA⁶, D. U. PFEIFFER⁵ AND J. M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO¹

¹ VISAVET Centre and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

² CEI Campus Moncloa, UCM-UPM, Madrid, Spain

³ Center for Animal Disease Modeling and Surveillance, Department of Medicine and Epidemiology, UC Davis, CA, USA

⁴ AHVLA Centre for Epidemiology & Risk Analysis, Animal Health Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone, Surrey, UK

⁵ RVC Veterinary Epidemiology, Economics and Public Health Group, Royal Veterinary College, North Mymms, London, UK

⁶ SVA Department of Disease Control and Epidemiology, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden

⁷ FLI Institute of Epidemiology, Friedrich-Loeffler-Institute, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald – Insel Riems, Germany

Received 3 April 2014; Final revision 25 July 2014; Accepted 27 July 2014

SUMMARY

In this globalized world, the spread of new, exotic and re-emerging diseases has become one of the most important threats to animal production and public health. This systematic review analyses conventional and novel early detection methods applied to surveillance. In all, 125 scientific documents were considered for this study. Exotic ($n = 49$) and re-emerging ($n = 27$) diseases constituted the most frequently represented health threats. In addition, the majority of studies were related to zoonoses ($n = 66$). The approaches found in the review could be divided in surveillance modalities, both active ($n = 23$) and passive ($n = 5$); and tools and methodologies that support surveillance activities ($n = 57$). Combinations of surveillance modalities and tools ($n = 40$) were also found. Risk-based approaches were very common ($n = 60$), especially in the papers describing tools and methodologies ($n = 50$). The main applications, benefits and limitations of each approach were extracted from the papers. This information will be very useful for informing the development of tools to facilitate the design of cost-effective surveillance strategies. Thus, the current literature review provides key information about the advantages, disadvantages, limitations and potential application of methodologies for the early detection of new, exotic and re-emerging diseases.

Key words: Animal health, surveillance, early detection, emerging diseases, exotic diseases, systematic review.

* Author for correspondence: Mr V. Rodríguez-Prieto, VISAVET Centre and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

† These authors served as joint first authors.

(Email: victor@sanidadanimal.info)